

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA DO ROSÁRIO BATISTA FRANCESCHI

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS DA
MATA ATLÂNTICA UTILIZANDO A TÉCNICA “*THIN CELL LAYER*”

CURITIBA

2013

CRISTINA DO ROSÁRIO BATISTA FRANCESCHI

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS
DA MATA ATLÂNTICA UTILIZANDO A TÉCNICA “*THIN CELL LAYER*”

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Botânica, Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas

Coorientador: Prof.^a Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BOTÂNICA



“Conservação de sementes e micropropagação de orquídeas epífitas da Mata Atlântica utilizando a técnica “thin cell layer”.”

por

CRISTINA DO ROSÁRIO BATISTA FRANCESCHI

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores

Profª Drª Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)- PRESIDENTE

Prof Dr Lirio Luiz Dal Vesco (UFSC)

Prof Dr Luiz Antonio Biasi (UFPR)

Curitiba, 29 de maio de 2013.

Aos meus pais,
Antônio e Placidina

E ao meu esposo Jemerson
OFEREÇO

A Iolanda Novadzki,
E a minha amada família

DEDICO

“Se não houver frutos,
Valeu a beleza das flores;
Se não houver flores,
Valeu a sombra das folhas;
Se não houver folhas,
Valeu a intenção da semente”

Maurício Francisco Ceolin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e aos meus pais, Antonio e Placidina, que são razão da minha existência. Ao meu querido esposo, Jemerson, que traz luz a minha vida e tornou a minha jornada possível. AMO MUITO VOCÊS!

A toda a minha família por todo o amor, por sempre me incentivar, acreditar em minha capacidade e me fazer acreditar também, pelo ombro amigo, pelas inúmeras horas de conversa e pela dedicação. AMO VOCÊS ETERNAMENTE.

À Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas e ao Professor Dr. Eric Camargo Smith pela atenção, paciência, pelas inúmeras correções, por me aceitar como orientanda e por transmitir seus conhecimentos.

Ao Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB – CAPES) pela concessão de bolsa e verba.

A equipe do Orquidário Dr. Frederico Carlos Hoehne, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo auxílio na realização desse trabalho e pela permissão do uso das plantas.

Ao Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, pelo auxílio.

Aos Professores André Padial e Henrique Koehler pelo suporte estatístico, Marguerite Quoirin e Cleusa Bona pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de micropropagação de plantas: Danielle Lopes Ferreira, João Henrique Padilha, Rodrigo Cordeiro, Sheila Silveira, Silvia Almeida, Tamiris Burda e a agregada Juliana Wojciechowski agradeço pela ajuda e pelas risadas. E aos estagiários que me ajudaram ao longo desses dois anos: Lucas Pereira Gomes, Valéria Bini, Pedro Franzoi.

À querida Luciana Pelegrini pela amizade e inúmeros conselhos científicos sempre tão valiosos.

E a todos que acompanharam minha jornada ao longo desses dois anos e que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

A todos o meu: MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Os bancos de sementes para a conservação de germoplasma *ex situ* aliados com técnicas de cultura de tecidos têm auxiliado na preservação de espécies, tendo como uma de suas principais vantagens a obtenção de um grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de conservação e de germinação *in vitro* de sementes de *Brasilidium praetextum*, *Brasilidium forbesii*, *Gomesa recurva*, *Grandiphyllum pulvinatum* e de micropropagação de *B. praetextum* e *G. pulvinatum* utilizando a técnica TCLt para produção de mudas em grande escala. Sementes recém colhidas de *B. praetextum*, *B. forbesii*, *G. recurva* e *G. pulvinatum* foram germinadas *in vitro* nos meios MS, MS/2, WPM e KC. As melhores respostas de germinação ocorreram no meio WPM que foi utilizado posteriormente para avaliar as sementes após o armazenamento e para a micropropagação. As sementes foram armazenadas a -20 e -80°C por um, seis e 12 meses. Para avaliar o potencial germinativo das sementes foram realizados dois testes o do tetrazólio (TZ) e o de germinação *in vitro* em meio de cultura WPM. A melhor temperatura de armazenamento para *G. pulvinatum*, *G. recurva* e *B. praetextum* foi -80°C e para *B. forbesii* -20°C. A viabilidade das sementes foi maior após 12 meses de armazenamento. Para a regeneração de PLBs utilizando a técnica TCLt foram utilizados protocormos e folhas obtidos de sementes germinadas *in vitro* de *B. praetextum* e *G. pulvinatum*. Foram avaliados: o tipo, a região do explante e concentrações de reguladores vegetais na regeneração de PLBs. TCLt de folhas e de protocormos foram inoculadas em meio de cultura WPM, acrescido de 0-24 µM de BA ou NAA. Após 60 dias, os PLBs regenerados foram subcultivados para meio de cultura WPM contendo carvão ativado (0; 1,5 ou 3 g.L⁻¹), AIB (0; 2 ou 4 µM), BA ou NAA (0, 2,5 ou 5 µM) para alongamento e enraizamento. As mudas foram transplantadas e aclimatizadas em substrato vermiculita e Plantmax® florestal (3:1) ou fibra de coco em pó e Plantmax® florestal (1:1). Para as duas espécies todas as regiões do protocormo foram responsivas. A citocinina BA em baixa concentração (0,5 µM) foi eficiente para aumentar a porcentagem e o número de PLBs regenerados a partir de TCLt de protocormos de *B. praetextum*. Para a TCLt de folhas a região mais responsiva foi a basal em ambas as espécies. As melhores respostas para *G. pulvinatum* foram obtidas com protocormos quando comparados com folhas. A adição de carvão ativado e de reguladores vegetais em meio de cultura não influenciou no enraizamento e crescimento *in vitro* das plantas regeneradas. As plantas aclimatizadas apresentaram alta porcentagem de sobrevivência, após 120 dias do transplante em substrato vermiculita e Plantmax® florestal (3:1). Foi estabelecido um protocolo eficiente de micropropagação de *G. pulvinatum* utilizando protocormos obtidos da germinação *in vitro* e de *B. praetextum* utilizando protocormos e folhas jovens por meio da técnica TCL.

Palavras-chave: TCLt, regeneração de PLBs, banco de sementes, tetrazólio.

ABSTRACT

Seed banks for the conservation of germplasm combined with ex situ tissue culture techniques have helped to preserve species, having as one of its main advantages of obtaining large numbers of individuals and small space under aseptic conditions. The aim of this study was to develop a protocol for storage and in vitro germination of seeds *Brasilidium praetextum*, *Brasilidium forbesii*, *Gomesa recurva*, *Grandiphyllum pulvinatum* and micropropagation of *B. praetextum* and *G. pulvinatum* tTCL using the technique to produce seedlings on a large scale. Fresh seeds of *B. praetextum*, *B. forbesii*, *G. recurva* and *G. pulvinatum* were germinated in vitro on MS medium, MS/2, and KC WPM. The best responses germination occurred in WPM, which was subsequently used to evaluate the seeds after storage for micropropagation. The seeds were stored at -20 and -80°C for six and 12 months. To evaluate the seed germination tests were two of the tetrazolium (TZ) and germination in vitro in WPM. The best temperature for storage *G. pulvinatum*, *G. recurva* and *B. praetextum* was 80°C and *B. forbesii* -20°C. Seed viability was greater after 12 months of storage. For regeneration using the technique tCLT PLBs were used protocorms obtained from leaves and seeds germinated in vitro *B. praetextum* and *G. pulvinatum*. Were evaluated: type, region of the explant and concentrations of plant growth regulators on the regeneration of PLBs. tCLT leaves and protocorms were inoculated in WPM, plus 0-24 µM of BA and NAA. After 60 days, the regenerated PLBs were subcultured to WPM containing activated carbon (0; 1,5 or 3 g L⁻¹), IBA (0, 2 or 4 mM), BA and NAA (0; 2, 5 or 5 µM) for elongation and rooting. The seedlings were transplanted and acclimatized in vermiculite and forest Plantmax® (3:1) or coir dust and forest Plantmax® (1:1). For both species all regions of protocorm were responsive. The cytokinin 6-BA at low concentration (0,5 µM) was effective to increase the percentage and number of PLBs regenerated from protocorm tCLT *B. praetextum*. For tCLT leaves the region was more responsive to baseline in both species. The best answers to *G. pulvinatum* with protocorms were obtained when compared to leaves. The addition of activated charcoal and plant growth regulators in the culture medium did not affect the in vitro rooting and growth of regenerated plants. The acclimatized plants showed high survival rate after 120 days of transplantation in vermiculite and forest Plantmax® (3:1). Established an efficient protocol for micropropagation of *G. pulvinatum* protocorms obtained using the in vitro germination and *B. praetextum* using protocorms and young leaves using the technique tTCL.

Keywords: tCLT, regeneration of PLBs, seed bank, tetrazolium, Orchidaceae

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva* AOS 60 DIAS DE CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, COM BASE NAS FORMULAÇÕES SALINAS WPM, MS E KC.....34

TABELA 2- VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva*, SUBMETIDAS AO TESTE DE TETRAZÓLIO, SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE -20 E -80°C.35

TABELA 3- PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva*, SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE -20 E -80°C POR UM ANO, EM MEIO WPM APÓS 75 DIAS DE SEMEADURA.....36

TABELA 4- ALTURA MÉDIA DAS PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum*, *Brasilidium praetextum*, *Brasilidium forbesii* e *Gomesa recurva* CULTIVADAS EM MEIO WPM CONTENDO 1 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO.....37

TABELA 5- SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* e *Brasilidium praetextum* APÓS 60 DIAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS PARA A ACLIMATIZAÇÃO.37

CAPÍTULO 2

TABELA 1- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE TCLt de *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....59

TABELA 2- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Brasilidium praetextum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....61

TABELA 3- ALTURA E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE PLANTAS DE *Brasilidium praetextum* ORIUNDAS DE PLBs REGENERADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO BA, CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO CARVÃO ATIVADO POR 60 DIAS.62

TABELA 4- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs EM TCLt DE *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA 1, 2, 3 (M1, M2 E M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....64

TABELA 5- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Brasilidium praetextum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA 1, 2, 3 (M1, M2 E M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....66

TABELA 6- PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE PLANTAS DE *Brasilidium praetextum* ORIUNDOS DE PLBs REGENERADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO BA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO AIB APÓS 60 DIAS.67

TABELA 7– NÚMERO TOTAL DE PLBs REGENERADOS NOS TCLts DE PROTOCORMOS OU FOLHAS DE *Brasilidium praetextum* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....71

CAPÍTULO 3

TABELA 1- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....88

TABELA 2- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Grandiphyllum pulvinatum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....89

TABELA 3- PORCENTAGEM DE EXPLANTES REGENERANDO PLBs DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> , EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.	91
TABELA 4- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> , EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	92
TABELA 5- ALTURA, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ (CMR) DE PLANTAS DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> ORIUNDOS DE TCLt DE PROTOCORMOS, CULTIVADOS EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA OU ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	93
TABELA 6- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	94
TABELA 7- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> , EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	95
TABELA 8- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	96
TABELA 9- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> , EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	97

TABELA 10- ALTURA (AL), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES (NR) E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ (CMR) DE PLANTAS DE <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> , CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO CARVÃO ATIVADO E CULTIVADO POR 60 DIAS.....	98
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: FLORES DE: A – *Brasilidium praetextum* (BARRA 2 CM), B – *Gomesa recurva* (1 CM), C– *Grandiphyllum pulvinatum* (BARRA 1 CM) E D- *Brasilidium forbesii* (BARRA 2 CM). FOTO: A- ERIC SMITH, B, C E D- ÍTALO SANTOS.48

FIGURA 2- A- SEMENTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* A- APÓS 90 DIAS DE SEMEADURA EM MEIO WPM, SEM PROTOCORMOS MORTOS, BARRA: 1 mm. B- E APÓS 90 DIAS DE SEMEADURA EM MEIO MS, COM PROTOCORMOS MORTOS, BARRA- 2mm.49

FIGURA 3: A- SEMENTES DE *Gomesa recurva* SUBMETIDAS AO TESTE DE TETRAZÓLIO APÓS 6 MESES DE ARMAZENAMENTO, SETA BRANCA: SEMENTES PALHA, SETA PRETA: SEMENTES INVIÁVEIS E SETA AMARELA SEMENTE VIÁVEL. B- SEMENTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* GERMINADAS EM MEIO DE CULTURA WPM APÓS 60 DIAS DA SEMEADURA, SETA BRANCA SEMENTES NÃO GERMINADAS. BARRA: 1 mm.49

CAPÍTULO 2

FIGURA 1- PLBs E PLANTAS DE *Brasilidium praetextum* REGENERADOS DE TCLt, A- TCLt BASAL DO PROTOCORMO COM PLBs APÓS 50 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM SEM REGULADOR VEGETAL (barra- 2mm), B- ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs FORMADOS EM MEIO ISENTO DE REGULADOR, CULTIVADOS EM MEIO WPM CONTENDO 1,5 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, APÓS 120 DIAS (Barra- 10 mm) C- PLBs FORMADOS EM MEIO CONTENDO 20 µM DE BA, CULTIVADOS EM MEIO WPM CONTENDO 1,5 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, APÓS 120 DIAS (Barra- 10 mm), D-REGIÃO BASAL DA FOLHA COM PLBs APÓS 50 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM COM 4 µM DE BA (barra- 3 mm, E- PLANTA REGENERADA, COM BULBO, EM MEIO DE CULTIVO WPM SEM ADIÇÃO DE REGULADOR VEGETAL COM CARVÃO ATIVADO, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO (barra- 2 mm), F- ENRAIZAMENTO DE PLANTAS REGENERADAS EM MEIO CONTENDO 0, 2 E 4 µM DE AIB, (barra- 10 mm) G- PLANTA EM SUBSTRATO PLANTMAX COM FIBRA DE COCO APÓS 90 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO (plantas com 20 mm).68

FIGURA 2- REGENERAÇÃO DE PLBs EM *Brasilidium praetextum*. A- CÉLULAS EPIDÉRMICAS E SUBEPIDÉRMICAS EM DIVISÃO CELULAR (SETA), B- INÍCIO DA FORMAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMO (SETA), C- DETALHE DO PLB FORMADO D- PRESENÇA DE PROTODERME DEFINIDA E AUSÊNCIA DE CONEXÃO VASCULAR COM O TECIDO MATERNO (SETA),70

FIGURA 3- ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Brasilidium praetextum* DESDE A GERMINAÇÃO *in vitro* EM MEIO DE CULTURA WPM, UTILIZANDO O PROTOCORMO E DUAS FOLHAS COMO FONTE DE EXPLANTE PARA A TÉCNICA TCLt.72

CAPÍTULO 3

FIGURA 1- REGENERAÇÃO DE PLBs DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum*:
A- REGIÃO BASAL DO PROTOCORMO CONTENDO PLBs APÓS 30 DIAS CULTIVADOS NO ESCURO EM MEIO WPM CONTENDO 0,5 μM DE BA (barra - 1 mm); **B-** REGIÃO BASAL DA FOLHA COM PLBs REGENERADOS APÓS 30 DIAS CULTIVADOS NO ESCURO EM MEIO WPM CONTENDO 0,5 μM DE BA (barra- 2 mm); **C-** PLANTAS CULTIVADAS EM WPM, ACRESCIDO DE 0; 1,5; 3 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (barra: 20 mm); **D-** PLANTAS ACLIMATIZADAS APÓS 90 DIAS EM PÓ DE COCO E PLANTMAX (barra: 20 mm). 100

FIGURA 2- PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* A PARTIR DA REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMOS GERMINADOS EM MEIO WPM. 102

FIGURA 3- PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* A PARTIR DA REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE FOLHAS GERMINADOS EM MEIO WPM..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4- diclorofenoxiacético

AIB: Ácido Indolbutírico

ANA: Ácido Naftaleno acético

BA: 6-benziladenina

CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

HMF: 5-hidroximetil-furfural

KC- Meio de Knudson (1946)

MS/2: Meio de Murashige e Skoog (1962) com a concentração de sais reduzidos pela metade.

MS: Meio de Murashige e Skoog (1962)

OSSSU: Orchid Seed Stores for Sustainable Use

PLBs: Protocorm-like bodies

PVP: Polivinilpirrolidona

TCLI: Thin cell layer longitudinal

TCLt: Thin cell layer transversal

TDZ: Tidiazuron

TZ: Teste do tetrazólio

VW: Meio de Vacin e Went (1949)

WPM: Meio de Lloyd e McCown (1980)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
REFERÊNCIAS	22
 CAPITULO I - CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Brasilidium forbesii</i> (Hook.) Campacci, <i>Brasilidium praetextum</i> (Rchb.f.) Campacci, <i>Grandiphyllum pulvinatum</i> Docha Neto E <i>Gomesa recurva</i> R. Br (ORCHIDACEAE)	26
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 POLINIZAÇÃO, COLETA DO FRUTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES	30
2.2 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES IN VITRO	31
2.3 TESTE DE TETRAZÓLIO	31
2.4 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO IN VITRO DAS SEMENTES	32
2.5 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO	33
3 RESULTADOS	33
3.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES IN VITRO	33
3.2 VIABILIDADE DAS SEMENTES APÓS ARMAZENAMENTO SEGUNDO O TESTE DO TETRAZÓLIO	34
3.3 EFEITO DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES IN VITRO	36
3.4 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO	37
4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	45
FIGURAS	48

**CAPÍTULO II - MICROPROPAGAÇÃO DE *Brasilidium praetextum* (Rchb.f.)
CAMPACCI UTILIZANDO A TÉCNICA “*Thin Cell Layer*” TRANSVERSAL (TCLt)**

.....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	55
2.2 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMOS	55
2.2.1 Alongamento e enraizamento dos PLBs regenerados de protocormos	56
2.3 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHAS.....	56
2.3.1 Enraizamento dos PLBs regenerados de folhas	56
2.4 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	57
2.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS.....	57
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
2.7 ANÁLISE MORFOANATÔMICA	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMOS	58
3.2 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS PLBs REGENERADOS A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMOS	62
3.3 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHAS.....	63
3.4 ENRAIZAMENTO DOS PLBs REGENERADOS DE TCLt DE FOLHAS.....	66
3.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO	67
3.6 ANÁLISE MORFOANATÔMICA	69
3.7 PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Brasilidium praetextum</i>	70
4 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS	78

**CAPÍTULO III - MICROPROPAGAÇÃO DE *Grandiphyllum pulvinatum* (Lindl.)
Docha Neto UTILIZANDO A TÉCNICA “*Thin Cell Layer*” TRANSVERSAL (TCLt)
DE PROTOCORMOS E DE FOLHAS**

RESUMO.....	80
ABSTRACT	81
1 INTRODUÇÃO	82
2 MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	84

2.2 REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMOS.....	85
2.2.1 Indução e regeneração de PLBs	85
2.2.2 Multiplicação, alongamento e enraizamento de PLBs.....	85
2.3 REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE FOLHAS	86
2.3.1 Indução e regeneração de PLBs	86
2.3.2 Alongamento e enraizamento dos PLBs	86
2.4 MEIOS DE CULTURA.....	86
2.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	87
2.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS.....	87
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	87
3 RESULTADOS.....	88
3.1 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMO UTILIZANDO BA.....	88
3.2 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMO UTILIZANDO ANA	90
3.3 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs.....	92
3.4 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHA UTILIZANDO BA.....	93
3.5 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHA UTILIZANDO ANA	96
3.6 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS PLBs	98
3.7 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS	99
3.8 ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE <i>G. pulvinatum</i>	101
4 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma das maiores floras orquidáceas do mundo, das quais muitas são epífitas e endêmicas, representadas por 240 gêneros e 2443 espécies das quais 1634 são endêmicas (BARROS *et al.*, 2013).

As plantas dos gêneros *Brasilidium* e *Grandiphyllum* apresentam em sua maioria inflorescências exuberantes nas cores amarela ou marrom, com flores de vida longa, vistosas e perfumadas (DOCHA NETO, BAPTISTA e CAMPACCI, 2006). As plantas de *Gomesa recurva* são nativas, não endêmicas do Brasil, apresentam flores amarelas e podem ser encontradas no sudeste, nordeste e sul do Espírito Santo a Santa Catarina (BARROS *et al.* 2013).

Toda a família Orchidaceae está listada no Apêndice II da CITES (“Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora”) que inclui espécies em que o comércio deve ser controlado. Isso significa que todas as espécies de orquídeas apresentam algum interesse de conservação (FAY e CHASE, 2009).

Bancos de sementes de orquídeas têm se mostrado uma ferramenta valiosa para manutenção de diversidade genética em um espaço mínimo, com potencial para permitir a conservação de material valioso para a possível re-introdução em programas de restauração de habitat no futuro. O projeto da Darwin Initiative “Orchid Seed Stores for Sustainable Use” (OSSSU), está atualmente estabelecendo uma rede global de bancos de sementes de orquídeas centrado inicialmente em países com alta biodiversidade de orquídeas na Ásia e América Latina (SEATON *et al.*, 2010). No Brasil, a UFPR e a UNIOESTE foram convidadas a participar, sendo de extrema importância incluir alguns gêneros de orquídeas como *Brasilidium*, *Grandiphyllum* e *Gomesa* em banco de sementes para impedir que a degradação do seu habitat possa causar extinção das mesmas.

Para conservação *ex situ* de orquídeas (banco de sementes) são necessários que sejam realizados testes de viabilidade das sementes ao longo do tempo, para verificar se as mesmas ainda têm potencial germinativo. Os testes que podem ser realizados são o de germinação em condições controladas de laboratório e o teste bioquímico do tetrazólio (TZ). O teste de TZ reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, sendo um dos mais

utilizados na avaliação da qualidade e vigor das sementes. A hidrogenação do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio produz nas células vivas do embrião, uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifênil formazan (PINÃ-RODRIGUES *et al.*, 2004), permitindo distinguir as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm sua cor original (HOSOMI *et al.*, 2011).

A propagação natural das orquídeas é feita por meio de sementes, as quais contêm um embrião pequeno com cerca de 0,1 mm de diâmetro e não apresentam tecido de reserva associado. Com isso as sementes só germinam quando ocorre a interação simbiótica com certos gêneros de fungos. Na propagação *in vitro* as sementes são colocadas em condições ideais para germinarem, não sendo necessária a simbiose com o fungo (SOARES *et al.*, 2009). Após a germinação, o embrião forma uma pequena estrutura chamada protocormo, a partir do qual é formada a plântula (ARDITTI e ERNST, 1993; GEORGE *et al.*, 2008).

O método assimbiótico de germinação ou germinação *in vitro* de orquídeas foi estabelecido por Lewis Knudson em 1922. Os métodos *in vitro*, embora de custo elevado, têm uma capacidade produtiva e qualidade elevada, sendo adotados pelos estabelecimentos comerciais e até mesmo pelos orquidófilos (KLEIN, 2008). A produção de orquídeas a partir de técnicas de cultivo *in vitro* é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo. Com isso permite a aquisição de mudas com qualidade comprovada para os produtores de orquídeas e também para os programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2009).

As orquídeas eram consideradas plantas difíceis de propagação *in vitro*, com o surgimento da tecnologia “thin cell layer” (TCL) têm permitido a propagação clonal massal (TEIXEIRA DA SILVA, 2012). O sistema TCL consiste de explantes de tamanho pequeno que são seccionados longitudinalmente (TCLI) (0,5 a 1 mm de largura e 5-10 mm de comprimento) ou transversalmente (TCLt) (0,1-5 mm) de diferentes órgãos vegetais (caules, folhas, órgão florais, cotilédones ou embriões) (ROUT *et al.*, 2006; CHUGH *et al.*, 2009). TCLI contem só um tipo de tecido ou até seis camadas de células (TEIXEIRA DA SILVA e DOBÁNSZKI, 2013), enquanto TCLt inclui um pequeno número de células de diferentes tecidos: epiderme, córtex, câmbio, medula e parênquima (TRAN TRANH VAN, 1980). Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso na regeneração de várias espécies de orquídeas (MURTHY e

PYATI, 2001; PARK *et al.*, 2002; NHUT *et al.*, 2003; MAYER, 2006; CHUGH *et al.*, 2009; ROY *et al.*, 2011; GANTAIT e SINNIHAH, 2012).

O cultivo de explantes *in vitro* de orquídeas pode originar estruturas semelhantes à protocormos que são denominados “protocorm like bodies” (PLBs) que podem multiplicar ou se desenvolver formando plântulas (ARDITTI e ERNST, 1993; GEORGE *et al.*, 2008). Os reguladores vegetais utilizados com maior frequência para indução e multiplicação de PLBs são: benziladenina (BA), ácido naftalenoacético (ANA), tidiazuron (TDZ) e o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) em concentrações que variam de 0,05 a 40 µM (LAKSHMANAN *et al.*, 1995; MURTHY e PYATI, 2001; MAYER, 2006; GANTAIT e SINNIHAH, 2012).

Dentre os componentes que podem ser adicionados aos meios de cultura está o carvão ativado e o ácido indolbutírico (AIB), que tem promovido alguns efeitos benéficos para o alongamento ou enraizamento das plantas (NAYAK *et al.*, 2002; ASGHAR *et al.*, 2011; GALDIANO JUNIOR *et al.*, 2011; SCHNEIDERS *et al.*, 2012)

O transplântio e aclimatização de mudas é uma fase crítica e deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese e absorção de nutrientes. Por isso, é necessário cuidado na escolha do substrato. Os substratos vermiculita, Plantmax®, carvão vegetal e isopor moído, pó, fibra e casca de coco foram eficientes na aclimatização de espécies de orquídeas (MORAES *et al.*, 2002; COLOMBO *et al.*, 2005; DUTRA *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer um protocolo de conservação e de germinação *in vitro* de sementes de *Brasiliidium praetextum*, *Brasiliidium forbesii*, *Gomesa recurva* e *Grandiphyllum pulvinatum* e de micropropagação de *Brasiliidium praetextum* e *Grandiphyllum pulvinatum* utilizando a técnica TCLt para produção de mudas em grande escala.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a melhor formulação salina para o cultivo, identificar a temperatura ideal e o tempo de armazenamento das sementes de *B. praetextum*, *B. forbesii*, *G. recurva* e *G. pulvinatum*.
- Avaliar o potencial germinativo das sementes armazenadas por meio do teste de tetrazólio.
- Determinar o melhor tipo de explante (protocormos ou folhas) e a melhor região do explante para a indução e regeneração de PLBs de *B. praetextum* e *G. pulvinatum*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de reguladores vegetais na indução e regeneração de PLBs de *B. praetextum* e de *G. pulvinatum*;
- Verificar a influência do carvão ativado no alongamento e enraizamento *in vitro* de *B. praetextum* e de *G. pulvinatum*;
- Avaliar a influência de AIB no enraizamento *in vitro* de PLBs regenerados de folhas de *B. praetextum*;
- Estabelecer metodologia de transplântio e aclimatização das mudas de *B. praetextum* e de *G. pulvinatum*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M. RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences Maringá**, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: Wiley Publishers, 1993.

ASGHAR, S.; AHMAD, T.; HAFIZ, I. A.; YASEE, M. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of biotechnology**. v.10, n. 16, p. 3097- 3103, 2011.

BARROS, F. de; VINHOS, F. de; RODRIGUES, V. T., BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. *On line* disponível em: (<http://floradobrasil.ibri.gov.br/2010/FB000179>). Acesso em ago. 2013.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.

CHUGH, S.; GUHA, S.; USHA RAO, I. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

DOCHA NETO, A.; BAPTISTA D. H.; CAMPACCI, M. A. **Coletânea de Orquídeas Brasileiras 3 - Novos Gêneros (baseados em *Oncidium*)**. São Paulo: Editora Brasil Orquídeas, 2006.

DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination an in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, v. 96, n. 3, p.235-243, 2009.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**. v. 104, n. 3, p. 359–364, 2009.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; CASSOLI NETO, P.; MANTOVANI, C. Crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindley com adição de carvão ativado. **Revista Fafibe on line**, março, 2011. Acessado em 19/012013. Disponível em <http://www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistafafibeonline/sumario/16/30032011212607.pdf>

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' 3 *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments. **Plant Growth Regul**, v. 68, n.2, p. 129–140, 2012. DOI 10.1007/s10725-012-9698-y

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. vol.1, Dordrecht: Springer, 2008, p.46.

HOSOMI, S. T., SANTOS, R. B., CUSTÓDIO, C.C., SEATON, P. T., MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n.1, p.178-189, 2011.

KLEIN, E. H. S. **Levantamento e Desenvolvimento de Kit Diagnóstico de Patógenos e Propagação In Vitro de Orquídeas no Estado do Rio de Janeiro**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia e Biotecnologia Aplicada) Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

LAKSHMANAN, P. LOH, C.S, GOH, C.J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda* Deborah using thin section culture. **Plant Cell Reports**. v.14, n. 8, p. 510-514, 1995.

MAYER, J. L. S. **Anatomia e morfogênese in vitro de Cymbidium 'Joy Polis' (Orchidaceae)**. 124 f. Dissertação (Agronomia - Produção Vegetal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

MURTHY, H. N.; PYATI A. N. Micropropagation of *Aerides Maculosum* Lindl. (ORCHIDACEAE). **In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant**, v: 37, n.2, p. 223-226, 2001 DOI: 10.1079/IVP2000131

NAYAK, N.R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S.P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for apid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, n.1, p. 107–116, 2002

NHUT, D.T.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; ASWATH, C.R. The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 39, n.3, p. 266–276, 2003.

PARK, S.Y.; YEUNG, E.C.; CHAKRABARTY, D.; PEAK, K.Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports**, v. 21, n.1, p. 46-51, 2002.

PINÃ-RODRIGUES, F. C. M; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C.; Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283-297.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v.24, p.531-560, 2006.

ROY, A.R.; PATEL, R.S.; PATEL, V.V.; SAJEEV, S.; DEKA, B.C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n.3, p. 325–331, 2011.

SEATON, P. T.; HU, H. PERNER, H. PRITCHARD, H. W. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**, v. 76, n.2, p. 193–203, 2010. DOI 10.1007/s12229-010-9048-6

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, n.2, p. 185-191, 2012.

SOARES, J. D. R.; ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; DE ASSIS, F. A. de. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.3, p. 772-777, 2009.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, online 21 de dezembro de 2012. DOI 10.1007/S11240-012-0274-y.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRANSZKI, J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. **J Plant Growth Regulation**, online: 16 de maio de 2013. DOI 10.1007/S00344-013-9336-6.

TRAN THANH VAN, K. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **Int. Rev. Cytol.**, v.32, p.291-311, 1980.

CAPITULO I

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Brasilidium forbesii* (Hook.) Campacci, *Brasilidium praetextum* (Rchb.f.) Campacci, *Grandiphyllum pulvinatum* Docha Neto E *Gomesa recurva* R. Br (ORCHIDACEAE)

RESUMO

Bancos de sementes de orquídeas têm se mostrado uma ferramenta valiosa para a manutenção da diversidade genética em um espaço reduzido, com potencial para permitir a conservação de material valioso para a possível reintrodução em programas de restauração de habitat. Alguns gêneros de orquídeas como *Brasilidium*, *Grandiphyllum* e *Gomesa* devem ser incluídos em banco de sementes para impedir que a degradação do seu habitat possa causar extinção dos mesmos. O objetivo desse trabalho foi determinar a temperatura ideal e o tempo de armazenamento das sementes de *Brasilidium praetextum*, *B. forbesii*, *Gomesa recurva* e *Grandiphyllum pulvinatum* para a manutenção em bancos de sementes. Sementes recém colhidas foram desinfestadas e germinadas *in vitro* utilizando meios de cultura com base nas formulações salinas WPM, MS, MS/2 e KC. As sementes foram armazenadas a -20 e -80°C por um, seis e 12 meses. Para avaliar o potencial germinativo das sementes foram realizados dois testes o do tetrazólio (TZ) e o de germinação *in vitro* em meio de cultura WPM. As melhores respostas de germinação ocorreram com o uso do meio de cultura WPM. Todas as espécies apresentaram uma redução drástica da germinação após um mês e a maior viabilidade após 12 meses de armazenamento. A melhor temperatura de armazenamento para *Grandiphyllum pulvinatum*, *Gomesa recurva* e *Brasilidium praetextum* foi -80 °C e para *Brasilidium forbesii* -20°C. Com isso conclui-se que as sementes podem ser armazenadas por 12 meses sem perder a viabilidade.

Palavras - chave: Teste do tetrazólio, banco de sementes, viabilidade de sementes

Chapter I

SEED CONSERVATION OF *Brasilidium forbesii* (Hook.) Campacci, *Brasilidium praetextum* (Rchb.f.) Campacci, *Grandiphyllum pulvinatum* Docha Neto AND *Gomesa recurva* R. Br (ORCHIDACEAE)

ABSTRACT

Orchid seed banks have shown a valuable tool for genetic diversity maintenance in a minimum space, with potential for valuable material conservation to the possible re-introduction programs for habitat restoration. Some genera of orchids as *Brasilidium*, *Grandiphyllum* and *Gomesa* should be included in the seed bank to prevent that their habitat degradation can cause the extinction of the same. The aim of this study was to determine the optimum temperature and time of storage of *Brasilidium praetextum*, *B. forbesii*, *Gomesa recurva* and *Grandiphyllum pulvinatum* seeds for maintaining seed banks. Fresh seeds were sterilized and germinated in vitro in culture media WPM, MS, MS / 2 and KC. The seeds were stored at -20 and -80°C for six and 12 months. Two tests were made to evaluate the seed germination: the tetrazolium (TZ) test and the in vitro germination in WPM culture medium. The best rates of germination occurred in WPM. All species showed a drastic germination rate reduction after one month and greater viability after 12 months of storage. The best storage temperature for *Grandiphyllum pulvinatum*, *Gomesa recurva* and *Brasilidium praetextum* was -80°C and for *Brasilidium forbesii* was -20 °C. Therefore the conclusion of the study was that seeds can be stored for 12 months without losing viability.

Keywords: tetrazolium test, seedbank, viability of seeds

1 INTRODUÇÃO

As plantas dos gêneros *Brasilidium* e *Grandiphyllum* apresentam em sua maioria inflorescências exuberantes nas cores amarela ou marrom, com flores de vida longa, vistosas e perfumadas. As plantas de *Gomesa recurva* apresentam flores amarelas, são nativas e não endêmicas do Brasil. O vaso florido custa de 20 a 75 reais dependendo da espécie (DOCHA NETO, BAPTISTA e CAMPACCI, 2006, Sociedade Bandeirante orquídeas, 2010; BARROS *et al.*, 2013). Toda a família Orchidaceae apresenta interesse de conservação (FAY e CHASE, 2009).

Bancos de sementes de orquídeas têm se mostrado uma ferramenta valiosa para a manutenção da diversidade genética em um espaço mínimo, com potencial para permitir a conservação de material valioso para a possível re-introdução em programas de restauração de habitat no futuro (SEATON *et al.*, 2010). Alguns gêneros de orquídeas como *Brasilidium*, *Grandiphyllum* e *Gomesa* devem ser incluídos em banco de sementes para impedir que a degradação do seu habitat possa causar extinção das mesmas.

Os testes que podem ser realizados ao longo do tempo para verificar se as sementes mantêm o potencial germinativo são o de germinação em condições controladas de laboratório e o teste bioquímico do tetrazólio (TZ). O TZ reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, sendo um dos mais utilizados na avaliação de qualidade e vigor das sementes. A hidrogenação do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio produz nas células vivas do embrião uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifênil formazan (PINÃ-RODRIGUES *et al.*, 2004), que torna possível distinguir as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm sua cor original (HOSOMI *et al.*, 2011).

O método assimbiótico de germinação ou germinação *in vitro* de orquídeas foi estabelecido por Lewis Knudson, em 1922. Os métodos *in vitro*, embora de alto custo, têm uma capacidade produtiva e de qualidade elevada, sendo adotados pelos estabelecimentos comerciais e até mesmo pelos orquidófilos (KLEIN, 2008). As sementes de orquídeas apresentam dificuldade de germinação pelos métodos convencionais, por não terem reservas nutritivas e só germinam quando ocorre a interação simbiótica com certos gêneros de fungos. Na propagação *in vitro* as

sementes são colocadas em condições ideais para germinarem, não sendo necessária a simbiose com o fungo (SOARES *et al.*, 2009).

Os meios de cultura mais utilizados na germinação *in vitro* de orquídeas são o KC (KNUDSON, 1946), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) completo ou com a concentração de sais reduzidos a 1/10 (CHANG e CHANG, 2000) ou pela metade (VAN LE *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2007) e a do VW (VACIN e WENT, 1949) modificado (FERREIRA *et al.* 2010). O meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) foi utilizado no cultivo de *Brassocattleya x Laeliocattleya* (ARAUJO *et al.*, 2006), na micropropagação de *Cattleya loddigesii* (ARAUJO *et al.*, 2009) e na micropropagação de *Bulbophyllum peri* e *Epidendrum secundum* (FERREIRA, 2012).

A produção de orquídeas a partir de técnicas de cultivo *in vitro* é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo, suprimindo assim, a necessidade dos produtores de orquídeas na aquisição de mudas com qualidade comprovada e produzindo também plantas para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental (ARAUJO *et al.*, 2009).

Após a germinação, os explantes de orquídeas são subcultivados para meio de cultura sem regulador vegetal ou com auxina, para alongamento e enraizamento (HOSSAIN *et al.*, 2008, DUTRA *et al.*, 2009; ÁVILA-DÍAZ *et al.*, 2009; FERREIRA, 2012). O transplântio e a aclimatização das mudas têm ocorrido com combinações de substratos como Plantmax®, vermiculita, carvão vegetal, isopor moído, fibra e pó de coco com taxa de sobrevivência acima de 80% para espécies *Dendrobium nobile*, *Cattleya chocolate* e *Cyrtopodium punctatum* (MORAES, CAVALCANTE e FARIA, 2002, COLOMBO *et al.*, 2005; DUTRA *et al.*, 2009).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de conservação e germinação *in vitro* de sementes de *Brasilidium praetextum*, *Brasilidium forbesii*, *Gomesa recurva* e *Grandiphyllum pulvinatum*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 POLINIZAÇÃO, COLETA DO FRUTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

Foi realizado o processo de polinização manual cruzada nas flores de *G. recurva* e *B. forbesii* cultivadas no Orquidário Frederico Carlos Hoehne, Instituto de Botânica de São Paulo (SP). A polínia foi removida e inserida no estigma com o auxílio de um palito. O mesmo processo foi realizado nas plantas de *G. pulvinatum* e *B. praetextum* que estavam sendo cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, (UFPR, Curitiba, PR). Na figura 1 estão representadas as flores de *Brasilidium praetextum* (1A), *Gomesa recurva* (1B), *Grandiphyllum pulvinatum* (1C) e *Brasilidium forbesii* (1D).

O processo de secagem, teste de viabilidade e germinação *in vitro* ocorreram no Laboratório de Micropropagação de Plantas e o armazenamento das sementes no Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, ambos no Departamento de Botânica na UFPR.

O protocolo de secagem e armazenamento seguiu as indicações do projeto “Orchid Seed Storage for Sustainable Use” (OSSSU) conforme recomendação de Seaton e Ramsay (2005). As cápsulas iniciando a transformação da cor verde para amarelada ou marrom foram coletadas e mantidas em envelopes de papel até o início de sua abertura. Em seguida, as sementes foram colocadas em papel alumínio em dessecador de vidro, contendo solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl_2). O dessecador foi mantido em temperatura ambiente por cerca de sete dias. As sementes foram transferidas para pequenos frascos de vidro, etiquetados e armazenados em frascos de vidro maiores, juntamente com sílica laranja, usada como indicador de umidade dentro do frasco. Após este processo, as sementes foram armazenadas em freezer a -20°C e -80°C . Os testes de viabilidade das sementes foram realizados com sementes recém colhidas, após um, seis e doze meses de armazenamento.

2.2 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES IN VITRO

As sementes foram dessecadas e mantidas em refrigerador (4°C) por cinco dias. Em seguida foram desinfestadas em um frasco de capacidade de 50 ml contendo etanol 70% por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio 0,75% acrescido de 0,1 % de Tween® por cinco minutos. As sementes com a solução foram transferidas para um funil contendo papel filtro, onde foram realizadas seis lavagens com água destilada e autoclavada. As sementes depois de secas foram inoculadas com auxílio de uma espátula em meio de cultura com a formulação salina de WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS/2 (MS com a concentração de sais reduzidos pela metade) e KC (KNUDSON, 1982) acrescido aminoácidos, vitaminas, sacarose, de ágar Vetec nas concentrações informadas no anexo 1. Foram colocadas aproximadamente 500 sementes por placa de Petri e quatro repetições por tratamento. Em cada placa foram demarcadas três regiões contendo 100 sementes para o acompanhamento da germinação. Essas regiões foram fotografadas sempre na mesma posição e as imagens foram analisadas no computador com o auxílio do programa Photoshop® CS5. A germinação foi avaliada após 60 dias, sendo considerada germinada a semente que estava em estágio de protocormo com ápice caulinar e a porcentagem de mortalidade aos 90 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico ASSISTAT®.

2.3 TESTE DE TETRAZÓLIO

O teste de TZ foi realizado com a utilização de 2 mg de sementes, pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% por 24 horas. Após este período, as sementes foram transferidas para a solução neutra de tetrazólio 0,1%, mantidas por 24 horas em banho-maria à temperatura constante de 40°C e na ausência de luz. Em seguida, o material foi colocado em placa de vidro para ser analisado em estereomicroscópio. As sementes foram fotografadas em câmera digital e realizadas

contagens para verificar a porcentagem de sementes viáveis. As sementes foram classificadas em: viável: coloração vermelha carmim conforme a metodologia descrita por Hosomi *et al.* (2011). Foram contados 12 campos com 100 sementes, totalizando 1200 sementes.

O delineamento experimental foi bi-fatorial 3 x 2 sendo três tempos (um, seis e doze meses) e duas temperaturas de armazenamento (-20 e -80°C). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico ASSISTAT®.

2.4 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DAS SEMENTES

Nas mesmas datas da realização do teste do TZ, as sementes foram semeadas em meio de cultura básico WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). Foram colocadas aproximadamente 500 sementes por placa de Petri e três repetições por tratamento. Em cada placa foram demarcadas quatro regiões contendo 100 sementes para o acompanhamento da germinação. Essas regiões foram fotografadas sempre na mesma posição e as imagens foram analisadas no computador com o auxílio do programa Photoshop® CS5. A germinação foi avaliada após 75 dias, sendo considerada germinada a semente que estava em estágio de protocormo com ápice caulinar.

O delineamento experimental foi bi-fatorial 3 x 2 sendo três tempos (um, seis e doze meses) e duas temperaturas de armazenamento (-20 e -80°C). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico ASSISTAT®.

2.5 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Os protocormos das quatro espécies testadas germinados nos quatro meios de cultivo, após 90 dias da semeadura foram transferidos para meio WPM contendo 1 g.L^{-1} de carvão ativado onde ocorreu desenvolvimento de raízes. Após 120 dias, as plântulas foram subcultivadas para o mesmo meio de cultivo, onde foram mantidas por mais 90 dias. Em cada subcultivo foram colocadas 20 plântulas por cada frasco (capacidade de 250 ml), com cinco repetições, totalizando 100 plântulas.

Após 10 meses (90 dias de germinação + 120 dias 1º subcultivo e 90 dias do 2º subcultivo) de cultivo, as plântulas de *B. forbesii* e *G. recurva* foram subcultivadas, pois apresentavam tamanho reduzido, para o mesmo meio fresco por mais 120 dias e as plântulas de *B. praetextum* e *G. pulvinatum* foram aclimatizadas.

As plântulas de *B. praetextum* e *G. pulvinatum* foram transplantadas em bandeja de PVC com 50 células contendo o substrato vermiculita e Plantmax Florestal® (3:1) ou fibra de coco em pó e Plantmax Florestal® (1:1). Foram transplantadas 50 plântulas por substrato. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $24 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o dia e $20 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite). Nos primeiros dez dias foram pulverizadas com água manualmente duas vezes ao dia e após esse período a pulverização foi realizada apenas uma vez ao dia. Após 60 dias do transplântio foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plântulas.

3 RESULTADOS

3.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO*

A análise de variância revelou que houve diferença significativa entre os quatro meios de cultivo testados para a germinação (TABELA 1e ANEXO 2).

Para *G. pulvinatum* e *B. praetextum* o melhor meio para a germinação foi o WPM, seguido do meio MS/2 que apresentou a maior porcentagem de germinação e a menor mortalidade dos protocormos. Para as espécies *B. forbesii* não houve

diferença estatística entre os meios WPM e MS/2, porém o meio WPM apresentou menor mortalidade dos protocormos. Para *G. recurva* apenas o meio KC apresentou porcentagens inferiores de germinação e junto com o MS apresentaram maiores taxas de mortalidade após a germinação (TABELA 1, FIGURA 2A e B).

De uma maneira geral, o melhor meio de cultura para a germinação *in vitro* foi o WPM e o pior foi o KC para as quatro espécies estudadas (TABELA 1).

TABELA 1- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva* AOS 60 DIAS DE CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, COM BASE NAS FORMULAÇÕES SALINAS WPM, MS E KC.

Meios de cultura	<i>G. pulvinatum</i>		<i>B. praetextum</i>		<i>B. forbesii</i>		<i>G. recurva</i>	
	G (%)	M (%)	G (%)	M (%)	G (%)	M (%)	G (%)	M (%)
WPM	94,0 A	0,0	90,5 A	3,0	92,5 A	4,0	78,0 A	2,0
MS	82,5 C	25,0	70,3 C	43,0	79,0 B	49,0	80,5 A	29,0
MS/2	88,0 B	6,0	81,3 B	9,0	90,0 A	16,0	75,7 A	14,0
KC	58,5 D	54,0	62,5 D	51,0	56,5 C	38,0	55,5 B	34,0

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. G: germinação e M: mortalidade aos 90 dias.

3.2 VIABILIDADE DAS SEMENTES APÓS ARMAZENAMENTO SEGUNDO O TESTE DO TETRAZÓLIO

Os resultados da análise de variância mostraram que houve interação significativa entre o tempo e a temperatura de armazenamento para todas as espécies testadas, tanto para a viabilidade (TABELA 2 e ANEXO 3) como para a germinação *in vitro* (TABELA 3 e ANEXO 4).

G. recurva apresentou baixa porcentagem de sementes viáveis recém colhidas (61,7%) e armazenadas até seis meses independente da temperatura de armazenamento. Os melhores resultados foram obtidos após 12 meses de armazenamento independente da temperatura (TABELA 2 e FIGURA 3A).

As sementes de *G. pulvinatum* apresentaram baixa porcentagem de sementes viáveis para as sementes recém colhidas (55,3%) e armazenadas a -20°C por um mês (64,8%). Os melhores resultados ocorreram nas sementes armazenadas a -80°C, indicando que elas podem ser armazenadas por até 12 meses (TABELA 2 e FIGURA 3B).

B. praetextum também apresentou alta porcentagem de sementes viáveis, quando recém-colhidas (84,3%) e elevadas porcentagens na temperatura de -80 °C, indicando que essa espécie pode ser armazenada por até 12 doze meses (TABELA 2).

B. forbesii apresentou as maiores porcentagens de sementes recém colhidas e armazenadas por um mês independente da temperatura e por seis meses devem ser armazenadas a -20 °C (TABELA 2).

TABELA 2- VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva*, SUBMETIDAS AO TESTE DE TETRAZÓLIO, SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE -20 E - 80°C.

<i>Grandiphyllum pulvinatum</i>			<i>Brasilidium praetextum</i>		
Viabilidade das sementes (%)			Viabilidade das sementes (%)		
Tempo (mês)	-20 °C	-80°C	Tempo (mês)	-20°C	-80°C
0	55,3 Ca	55,3 Ca	0	84,3 Aa	84,3 Ca
1	64,8 Bb	84,8 Ba	1	81,7 Ab	90,1 Ba
6	84,3 Ab	91,3 Aa	6	65,7 Cb	96,1 Aa
12	83,8 Ab	91,5 Aa	12	71,3 Bb	83,7 Ca

<i>Brasilidium forbesii</i>			<i>Gomesa recurva</i>		
Viabilidade das sementes (%)			Viabilidade das sementes (%)		
Tempo (mês)	-20°C	-80°C	Tempo (mês)	-20°C	-80°C
0	91,4 Aa	91,4 Aa	0	61,7 Ba	61,7 Aa
1	91,8 Aa	92,4 Aa	1	38,5 Cb	62,5 Aa
6	93,9 Aa	62,5 Cb	6	59,6 Ba	57,4 Aa
12	64,0 Ba	66,5 Ba	12	86,0 Ab	90,4 Ba

Letras minúsculas na linha indicam similaridades entre temperaturas de um mesmo tempo de armazenamento; e letras maiúsculas na coluna indicam similaridades entre tempos de armazenamento para uma mesma temperatura. O teste de Tukey ($P < 0,05$) também considerou as sementes que não foram armazenadas, para visualizar a diferença entre a viabilidade de sementes recém-colhidas com as armazenadas.

3.3 EFEITO DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES *IN VITRO*

Todas as espécies testadas apresentaram comportamento semelhante, com porcentagens entre 60 e 70% de viabilidade das sementes quando recém colhidas. O período de um mês de armazenamento apresentou uma redução drástica da viabilidade das sementes, independente da temperatura (TABELA 3).

De uma maneira geral para as espécies *G. pulvinatum*, *B. praetextum* e *G. recurva* os melhores resultados de viabilidade das sementes foram obtidos com a temperatura de -80°C após 12 meses de armazenamento. No entanto, para *B. forbesii* recomenda-se armazenar as sementes a -20°C (TABELA 3 e FIGURA 3B).

TABELA 3- PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva*, SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE -20 E -80°C POR UM ANO, EM MEIO WPM APÓS 75 DIAS DE SEMEADURA.

<i>Grandiphyllum pulvinatum</i>			<i>Brasilidium praetextum</i>		
Germinação (%)			Germinação (%)		
Tempo (mês)	-20°C	-80°C	Tempo (mês)	-20°C	-80°C
0	58,0 Aa	58,0 Ca	0	67,7 Aa	67,7 Ba
1	1,3 Ca	3,0 Da	1	20,5 Cb	26,8 Ca
6	56,0 Ab	70,0 Ba	6	19,3 Cb	75,7 Aa
12	51,0 Bb	80,2 Aa	12	50,6 Bb	76,7 Aa

<i>Brasilidium forbesii</i>			<i>Gomesa recurva</i>		
Germinação (%)			Germinação (%)		
Tempo (mês)	-20°C	-80°C	Tempo (mês)	-20°C	-80°C
0	63,1 Ba	63,1 Ba	0	75,4 Aa	75,4 Ba
1	0,7 Da	0,9 Da	1	2,0 Ca	2,0 Ca
6	55,7 Ca	45,4 Cb	6	68,2 Bb	72,2 Ba
12	93,0 Aa	79,8 Ab	12	70,4 Bb	90,7 Aa

Letras minúsculas na linha indicam similaridades entre temperaturas de um mesmo tempo de armazenamento e letras maiúsculas na coluna indicam similaridades entre tempos de armazenamento para uma mesma temperatura. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

3.4 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Após a transferência dos protocormos para o meio WPM contendo 1 g. L⁻¹ de carvão ativado, as plântulas de *B. praetextum* e *G. pulvinatum* apresentaram crescimento lento atingindo 1 cm após 120 dias. As plântulas subcultivadas para o mesmo meio apresentaram em média 3 cm, após 90 dias.

As plantas de *G. recurva* e *B. forbesii* apresentaram crescimento mais lento que as demais espécies, sendo que após os 10 meses de cultivo atingiram em média 1,5 cm (TABELA 4).

Após o primeiro subcultivo todas as plantas das quatro espécies possuíam raízes (TABELA 4).

TABELA 4- ALTURA MÉDIA DAS PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum*, *Brasilidium praetextum*, *Brasilidium forbesii* e *Gomesa recurva* CULTIVADAS EM MEIO WPM CONTENDO 1 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO

Espécies	Altura (cm)		
	Germinação	1° subcultivo (120 dias)	2° subcultivo (90 dias)
<i>G. pulvinatum</i>	0,3	1,3	3,2
<i>B. praetextum</i>	0,3	1,1	3,0
<i>B. forbesii</i>	0,2	0,4	1,5
<i>G. recurva</i>	0,2	0,6	1,5

A aclimatização das plantas de *Brasilidium praetextum* e *G. pulvinatum* apresentou elevada porcentagem de sobrevivência, acima de 94% nos dois substratos testados após 60 dias do transplântio (TABELA 5).

TABELA 5- SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* e *Brasilidium praetextum* APÓS 60 DIAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS PARA A ACLIMATIZAÇÃO.

Substrato	Sobrevivência (%)	
	<i>Grandiphyllum pulvinatum</i>	<i>Brasilidium praetextum</i>
Vermiculita + Plantmax®	94,0	94,0
Fibra de coco + Plantmax®	92,0	94,0

4 DISCUSSÃO

A maior porcentagem de germinação obtida no meio de cultura WPM, seguido do MS/2 reforça a hipótese de que algumas espécies de orquídeas cultivadas *in vitro* necessitam da baixa concentração dos sais minerais no meio de cultura, uma vez que vivem em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes. A diferença de resposta entre os meios WPM e o KC, que são meios mais diluídos, pode ser devido ao meio KC não possuir vitaminas e aminoácidos, que são necessários para o crescimento *in vitro* (STANCATO *et al.*, 2008). O meio WPM apresenta concentrações intermediárias de íons importantes, como K^+ , Ca^+ , NH_4^+ e NO_3^- , comparado às concentrações dos meios MS, MS/2 e KC, evitando um possível excesso ou falta de sais (FERREIRA, 2012). No entanto, Pierik *et al.* (1988) relataram que a adição de vitaminas não interferiu na germinação de *Paphiopedilum ciliolare*.

Os protocormos cultivados apresentaram elevada mortalidade aos 90 dias nos meios MS e KC. Esses meios apresentam composição mineral muito diferente, com o MS, enriquecido com macro e micronutrientes, acrescido de vitaminas e o KC, que comparativamente apresenta baixa quantidade de nutrientes e ausência de vitaminas. Isso vem comprovando que os meios são específicos para cada espécie como vem sendo relatado para muitas orquídeas (ARDITTI e ERNST, 1984). Hosomi *et al* (2012) obtiveram resultado semelhante para espécies de *Cattleya* cultivadas em meio KC, com os protocormos necrosando após 63 dias. Da mesma forma, o meio MS não foi eficiente para a germinação e desenvolvimento inicial de *Habenaria macroceratitis* ocorrendo a mortalidade dos protocormos antes do aparecimento do protomeristema (STEWART e KANE, 2006).

Nesse estudo os resultados de viabilidade das sementes pelo teste de germinação e pelo teste de TZ apresentaram diferenças. As diferenças observadas podem ser devido ao pré- tratamento, 24 horas em sacarose 10%, que foi realizado nas sementes submetidas ao teste de TZ e que não foi realizado nas sementes germinadas. Outra possibilidade da maior viabilidade do teste de TZ em relação de germinação podem ter ocorrido devido ao protocolo de desinfestação que pode ter causado danos ao embrião (JOHNSON, KANE, 2007). Os dois testes são considerados comparáveis mais, no entanto, na germinação as sementes podem estar dormentes ou dependentes de sinalização simbiótica ou ambiental

(VUJANOVIC *et al.*, 2000). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os dois testes para 11 das 16 espécies avaliadas por Alvarez- Pardo e Ferreira (2006) e dez espécies de *Cattleya* (HOSOMI, 2012). Ao contrário foi observado para *Eulophia alta*, em que o teste de TZ indicou menor viabilidade das sementes do que foi obtido na germinação (JOHNSON *et al.*, 2007).

O teste de germinação detectou a diminuição drástica da germinabilidade das sementes das quatro espécies avaliadas após um mês de armazenamento. O mesmo não foi observado por Hosomi (2012), pois a germinação das sementes de dez espécies de *Cattleya* armazenadas a -18°C por três meses foram mantidas ou aumentaram. Ferreira (2012) observou a diminuição da viabilidade das sementes de *Epidendrum secundum* armazenadas a -20 °C por um período muito mais longo (12 meses).

As maiores porcentagens de germinação das sementes das quatro espécies estudadas ocorreram após 12 meses de armazenamento. Esses resultados não foram observados por Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) em que houve perda da viabilidade (no teste de germinação) das sementes de varias espécies tais como *Oncidium pumilum*, após 12 meses de armazenamento (-18°C). Já outras espécies como, *Oncidium flexuosum* não apresentaram diminuição da viabilidade germinativa após 12 meses de armazenamento a -18°C.

Diferenças na germinabilidade após armazenamento nas duas temperaturas testadas também variou conforme a espécie. Para *G. pulvinatum*, *B. praetextum* e *G. recurva* a melhor temperatura de armazenamento foi de -80°C e para *B. forbesii* foi de -20°C. Resultado semelhante foi obtido por Hay *et al.* (2010) que quando testaram temperaturas entre 23°C e -196°C, observaram que a temperatura de -18°C foi a ideal para a manutenção da viabilidade de sementes de várias espécies de orquídeas, como por exemplo *Diuris laxiflora*. No entanto, para *Pterostylis recurva* a melhor temperatura foi de -80°C.

As sementes de *G. recurva*, *B. praetextum* e *G. pulvinatum*, armazenadas a -80°C por 12 meses apresentaram aumento na porcentagem de germinação. Isso pode ter ocorrido devido a alterações na membrana durante o processo de congelamento estimulando vias metabólicas para superação de dormência (BEWLEY e BLACK, 1994).

5 CONCLUSÕES

O melhor meio de cultivo para a germinação *in vitro* foi o WPM que apresentou as maiores porcentagens de germinação e menor mortalidade dos protocormos.

A melhor temperatura de armazenamento para *Grandiphyllum pulvinatum*, *Gomesa recurva* e *Brasilidium praetextum* foi -80 °C e para *Brasilidium forbesii* -20°C. A viabilidade das sementes foi maior após 12 meses de armazenamento.

Tempos de armazenamento mais longos deverão ser testados para manutenção em bancos de sementes.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de Sementes de Orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n. 2, p.92-98, 2006.
- ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. da; VILLA, F.; ROCHA, H. S.; COSTA, F. C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídea em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n.2, p. 68-73, 2006.
- ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M. RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J.; **Orchid Biology, Reviews and Perspectives**, vol. 3. New York: Academic Press, p. 177–222. 1984.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C. SALGADO-GARCIGLIA, R. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 99, n.3, p. 335–343, 2009. DOI 10.1007/s11240-009-9609-8
- BARROS, F. de; VINHOS, F. de; RODRIGUES, V. T., BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>). Acesso em ago. 2013.
- BEWLEY, J.D. BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1994.
- CHANG, C.; CHANG, W. C. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 2, p. 171–175, 2000.
- COLOMBO L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.

DOCHA NETO, A.; BAPTISTA D. H.; CAMPACCI, M. A. **Coletânea de Orquídeas Brasileiras 3 - Novos Gêneros (baseados em *Oncidium*)**. São Paulo: Editora Brasil Orquídeas, 2006.

DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, v. 96, n.3, p.235-243, 2009.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**. v. 104, n.3, p. 359–364, 2009.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T. de.; RIBEIRO, J. P. N. CASALI, C. A. Propagação in vitro de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.3, p. 636-639, 2010.

FERREIRA, D. L. **Banco de sementes e sistemas de propagação in vitro como estratégia de conservação para *Bulbophyllum peri* Schltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

HAY, F.R.; MERRITT, D.J.; SOANES, J.A.; DIXON, K.W. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.164, n.1, p. 26-41, 2010.

HOSSAIN, M.M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 20, p.3614-3619, 2008.

HOSOMI, S. T., SANTOS, R. B., CUSTODIO, C.C., SEATON, P. T., MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n.1, p.178-189, 2011.

HOSOMI, S. T.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.48, n. 1, p. 127-136, 2012.

JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; DUTRA, D.; KANE, M. E. RICHARDSON, L. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)- preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 90, n. 3, p. 313-323, 2007.

JOHNSON, T. R.; KANE, M. E. Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: in vitro germination and development of three hybrids. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. v. 91 n. 3, p.251–261, 2007.

KLEIN, E. H. S. **Levantamento e Desenvolvimento de Kit Diagnóstico de Patógenos e Propagação In Vitro de Orquídeas no Estado do Rio de Janeiro**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia e Biotecnologia Aplicada) Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, p. 214- 217, 1946.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p.421-427, 1980.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PIERIK, R. L. M.; SPRENKELS, P.A.; VAN DER HARST B.; VAN DER MEYS Q.G. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. in vitro **Scientia Horticulturae**, v.34, n. 1, p. 139-153, 1988.

PINÃ-RODRIGUES, F. C. M; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C.; Testes de qualidade. In: _FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283-297.

SEATON, P. T.; M. M. RAMSAY. **Growing Orchids from Seed**. Royal Botanic Gardens Kew, 2005, p. 21.

SEATON, P. T.; HU, H. PERNER, H. PRITCHARD, H. W. Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. **Botanical Review**, v. 76, n.2, p. 193–203, 2010. DOI 10.1007/s12229-010-9048-6

SOARES, J. D. R.; ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; DE ASSIS, F. A. de. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.3, p. 772-777, 2009.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F. FURLANI, A. M. A. C. Crescimento de orquídeas epífitas in vitro: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n.1, p. 51-57, 2008.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tiss Organ cult**, v. 86, p.147-158, 2006.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, n.4, p. 605-613, 1949.

VUJANOVIC, V.; S.T-ARNOLD, M.; BARABE, D.; THIBEAULT, G.; Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. **Ann Bot.** v. 86, n. 1, p. 79–86, 2000.

VAN LE, B.; HANG PHUONG, N.T.; ANH HONG, L.T.; TRAN THANH VAN, K. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers. **Plant Growth Regulation**, v. 28, v.3, p. 79-185, 1999.

ZHAO, P.; WANG, W.; FENG, F.S., WU, F.; YANG, Z.; WANG-JAN, W. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 2, p. 131–139, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA GERMINAÇÃO DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva* em mg.L⁻¹

Componentes	MS (1962)	MS/2	Woody Plant Medium (1980)	Knudson (Arditti, 1982)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	370	250
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	96	-
KNO ₃	1900	950	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	1000
NH ₄ NO ₃	1650	825	400	-
KH ₂ PO ₄	170	85	170	250
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,3	13,9	27,8	25
Na ₂ EDTA	37,3	18,65	33,6	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	11,15	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	22,3	7.5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3	8,6	0,331
MoO ₃	-	-	-	0,016
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,012	0,25	0,0624
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,012	-	-
KI	0,83	0,41	-	-
H ₃ BO ₃	6,2	3,1	6,2	0,056
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,12	0,25	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5	-
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	-
Tiamina HCl	0,1	0,1	1	-
Glicina	2	2	2	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000
Ágar	5600	5600	5600	5600

ANEXO 2- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *G. pulvinatum*, *B. praetextum*, *B. forbesii* E *G. recurva* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Espécie	Fonte de variação	GL	F	P	CV (%)
<i>G. pulvinatum</i>	Meios de cultura	3	977,402	<0,05	12,48
<i>B. praetextum</i>	Meios de cultura	3	604,083	<0,05	14,73
<i>B. forbesii</i>	Meios de cultura	3	1101,895	<0,05	5,32
<i>G. recurva</i>	Meios de cultura	3	519,75	<0,05	5,84

ANEXO 3- RESULTADOS DE UMA ANÁLISE DE VARIÂNCIA BI-FATORIAL MOSTRANDO DIFERENÇAS NA VIABILIDADE DE SEMENTES (SEGUNDO O TESTE DE TETRAZÓLIO) ENTRE TEMPERATURAS E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO.

Espécie	Fonte de variação	F	GL	P	CV (%)
<i>G. pulvinatum</i>	Tempo	103,8	2	<0,05	12,90
	Temperatura	186,3	1	<0,05	
	Interação	24,42	2	<0,05	
<i>B. praetextum</i>	Tempo	25,71	2	<0,05	5,66
	Temperatura	315,4	1	<0,05	
	Interação	49,71	2	<0,05	
<i>B. forbesii</i>	Tempo	453,11	2	<0,05	9,50
	Temperatura	167,8	1	<0,05	
	Interação	227,63	2	<0,05	
<i>G. recurva</i>	Tempo	446,39	2	<0,05	11,66
	Temperatura	64,93	1	<0,05	
	Interação	52,37	2	<0,05	

ANEXO 4- RESULTADOS DE UMA ANÁLISE DE VARIÂNCIA BI-FATORIAL MOSTRANDO DIFERENÇAS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES ENTRE TEMPERATURAS E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO.

Espécie	Fonte de variação	G.L	F	P	CV (%)
<i>G. pulvinatum</i>	Tempo	2	1694,271	<0,05	9,80
	Temperatura	1	220,308	<0,05	
	Interação	2	62,386	<0,05	
<i>B. praetextum</i>	Tempo	2	384,11	<0,05	11,20
	Temperatura	1	621,348	<0,05	
	Interação	2	150,827	<0,05	
<i>B. forbesii</i>	Tempo	2	1490,58	<0,05	11,88
	Temperatura	1	36,056	<0,05	
	Interação	2	10,036	<0,05	
<i>G. recurva</i>	Tempo	2	4831	<0,05	5,91
	Temperatura	1	130,04	<0,05	
	Interação	2	76,31	<0,05	

FIGURAS

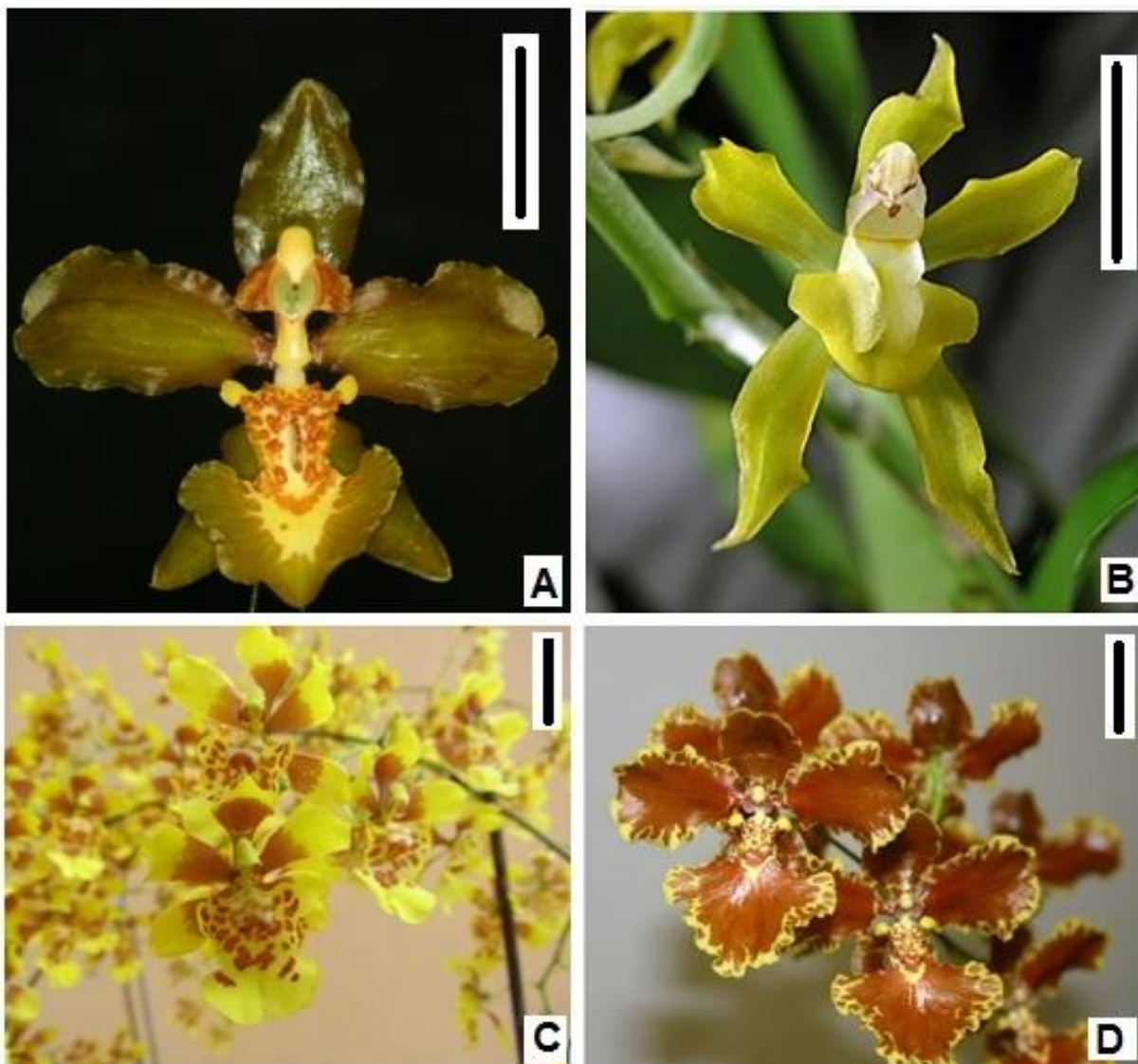


FIGURA 1: FLORES DE: A – *Brasilidium praetextum* (BARRA 2 CM), B – *Gomesa recurva* (1 CM), C– *Grandiphyllum pulvinatum* (BARRA 1 CM) E D- *Brasilidium forbesii* (BARRA 2 CM). FOTO: A- ERIC SMITH, B, C E D- ÍTALO SANTOS.

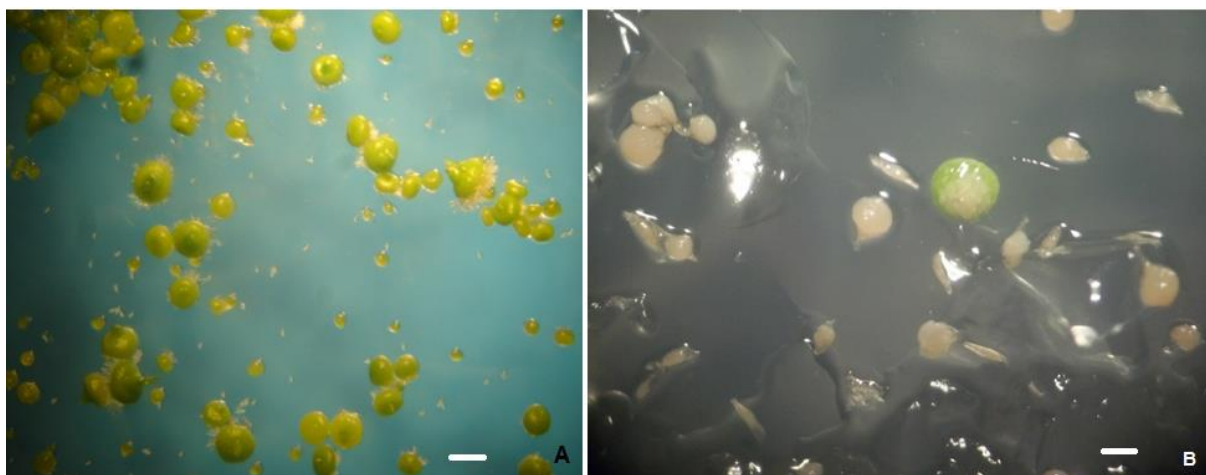


FIGURA 2- A- SEMENTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* A- APÓS 90 DIAS DE SEMEADURA EM MEIO WPM, SEM PROTOCORMOS MORTOS, BARRA: 1 mm. B- E APÓS 90 DIAS DE SEMEADURA EM MEIO MS, COM PROTOCORMOS MORTOS, BARRA- 2mm.

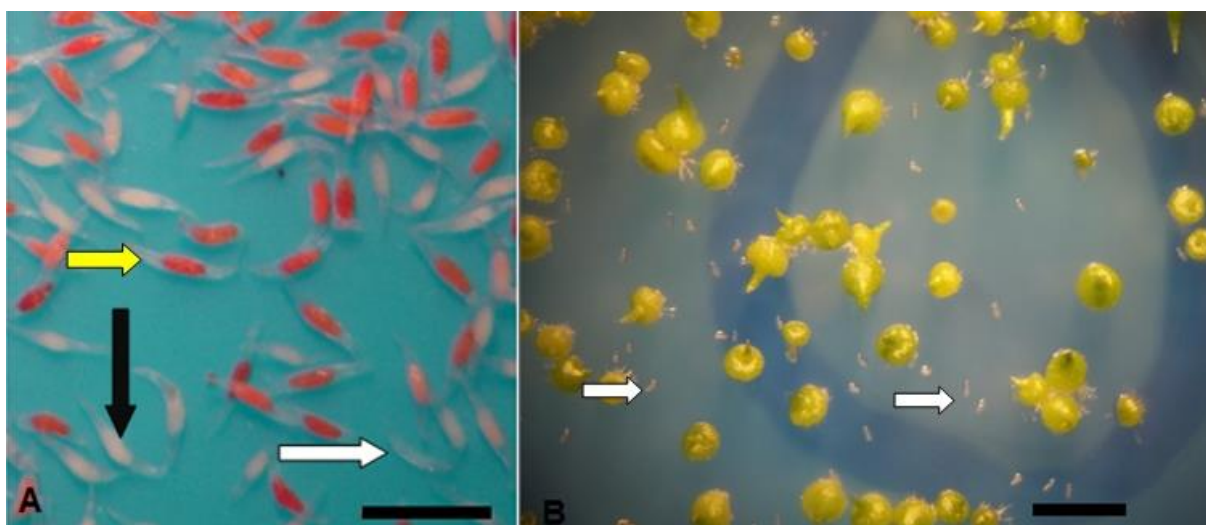


FIGURA 3: A- SEMENTES DE *Gomesa recurva* SUBMETIDAS AO TESTE DE TETRAZÓLIO APÓS 6 MESES DE ARMAZENAMENTO, SETA BRANCA: SEMENTES PALHA, SETA PRETA: SEMENTES INVIÁVEIS E SETA AMARELA SEMENTE VIÁVEL. B- SEMENTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* GERMINADAS EM MEIO DE CULTURA WPM APÓS 60 DIAS DA SEMEADURA, SETA BRANCA SEMENTES NÃO GERMINADAS. BARRA: 1 mm.

CAPÍTULO II

MICROPROPAGAÇÃO DE *Brasilidium praetextum* (Rchb.f.) CAMPACCI UTILIZANDO A TÉCNICA “*Thin Cell Layer*” TRANSVERSAL (TCLt)

RESUMO

As orquídeas são espécies de grande diversidade biológica e de importância econômica que apresentam dificuldade de propagação na natureza e muitas estão ameaçadas de extinção, devido à coleta predatória e destruição do habitat natural. As técnicas de cultivo *in vitro* possibilitam produção rápida de mudas. Assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar qual o tipo, região do explante e concentrações de BA mais eficientes na regeneração de PLBs utilizando a técnica TCLt para a propagação massal de mudas de *Brasilidium praetextum*. TCLt de folhas e de protocormos foram inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 e 24 μM de BA. Após 60 dias, os PLBs regenerados de protocormos foram subcultivados em meio de cultura WPM contendo carvão ativado (0; 1,5 ou 3 g.L^{-1}). Os PLBs regenerados de folhas foram subcultivados em meio de cultura WPM contendo 0; 2 ou 4 μM de AIB para alongamento e enraizamento. De maneira geral, todas as regiões do protocormo responderam bem. A citocinina BA em baixa concentração (0,5 μM) foi eficiente para aumentar a porcentagem e o número de PLBs regenerados a partir de TCLt de protocormos. Para a TCLt de folhas a região mais responsiva foi a basal e não é necessária a adição de regulador vegetal para a regeneração de PLBs. O estudo morfoanatômico indicou a regeneração direta dos PLBs a partir da epiderme e camadas subepidérmicas do protocormo. Para o alongamento e enraizamento o meio WPM foi eficiente, não sendo necessária a adição de AIB ou carvão ativado. As plantas foram aclimatizadas em bandejas de isopor contendo fibra de coco em pó e Plantmax® (1:1) ou vermiculita e Plantmax® (3:1) e apresentaram 94% de sobrevivência após 90 dias. Foi estabelecido um protocolo de micropropagação de *B. praetextum* utilizando a técnica TCLt a partir de protocormos e folhas jovens.

Palavras-chave: Orchidaceae, protocormos e folhas, regeneração de PLBs

CHAPTER II

Micropropagation of *Brasiliidium praetextum* (Rchb.f.) Campacci through transversal *thin cell layer* technique (tTCL)

ABSTRACT

The orchids are plants of great biological diversity, economic importance with have problems of propagation in nature. Many of them are threatened of extinction, due to predation and natural habitat destruction. The in vitro culture techniques enable rapid production of seedlings. Therefore, the aim of this study was to evaluate what explant type, explant region and BA concentrations more efficient in regeneration of PLBs using tTCL technique for mass propagation of *Brasiliidium praetextum* seedlings. Leaf segments and protocorms were inoculated in WPM, plus 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 μM BA. After 60 days, PLBs originated from protocorms were subcultured on WPM containing activated charcoal (0, 1.5 or 3.0 g.L^{-1}). The PLBs regenerated from leaves were subcultured on WPM containing 0, 2 or 4 μM IBA for elongation and rooting. In general, all protocorm regions had good answers. The cytokinin BA at low concentration (0.5 μM) was effective to increase the percentage and number of PLBs regenerated from protocorm tTCL. For tTCL from leaves, the base region was more responsive and did not require the addition of plant growth regulator for the regeneration of PLBs. The study indicated the morphoanatomical direct regeneration of PLBs from epidermal and subepidermal layers of the protocorm. Elongation and rooting for the WPM was efficient, not requiring the addition of IBA or activated charcoal. Plants were acclimatized in trays containing coconut fiber powder and Plantmax[®] (1:1) or vermiculite and Plantmax[®] (3:1) and showed 94% survival after 90 days. A protocol for micropropagation of *Brasiliidium praetextum* using the tTCL technique from protocorms and young leaves was established.

Keywords: Orchidaceae, protocorms and leaves, regeneration of PLBs

1 INTRODUÇÃO

As plantas de *Brasilidium praetextum* Campacci são epífitas endêmicas da Floresta Atlântica do Brasil. Possuem flores de vida longa, vistosas e perfumadas, dispostas em inflorescências exuberantes de cor marrom e amarela. Por apresentarem essas características, as espécies do gênero apresentam interesse comercial para a horticultura e para programas de conservação visando à reintrodução na natureza (DOCHA NETO, BAPTISTA e CAMPACCI, 2006).

As sementes de orquídea apresentam dificuldade para germinar, em sua área de ocorrência natural. Essa dificuldade está associada ao fato das sementes não possuírem reservas nutritivas e com isso necessitam de associação com fungos micorrízicos. Além disso, as sementes de orquídea apresentam crescimento lento (DRESSLER, 1981). Por isso, quase sempre são germinadas *in vitro*. O método assimbiótico de germinação ou germinação *in vitro* de orquídeas foi estabelecido por Lewis Knudson, em 1922. A germinação de orquídea inicia com o intumescimento da semente seguido pelo rompimento do tegumento seminal culminando com a liberação do embrião, que se desenvolve em uma estrutura tuberiforme, em geral clorofilada, denominada protocormo (ARDITTI e ERNEST, 1993).

Vários tipos de explantes podem ser utilizados na micropropagação de orquídea, tais como folhas ou protocormos, que quando seccionados desenvolvem “protocom-like bodies” (PLBs) (CHUGH *et al.*, 2009). Segundo Batygina *et al.* (2003) existem duas formas pelas quais os protocormos se diferenciam e são clonados: pela formação de um grande número de brotações apicais com formação de raízes adventícias e pela formação de muitos protocormos secundários a partir de células epidérmicas de um protocormo.

A técnica “thin cell layer” (TCL) utiliza um explante muito pequeno que pode ser seccionado longitudinalmente (TCLI), sendo constituído apenas um tipo de tecido tal como um monocamada de células da epiderme de ou até seis camadas de células ou a secção pode ser transversal (TCLt) apresentando vários tipos de tecidos como um pequeno número de células de diferentes tipos de tecidos tais como epiderme, cortex, câmbio, medula e células do parênquima (TEIXEIRA DA SILVA e DOBÁNSZKI, 2013). Atualmente é possível a propagação massal de muitas espécies de plantas economicamente importantes por meio dessa técnica (NHUT *et al.*, 2003). Segmentos de protocormos e folhas juvenis de protocormos possuem alta

capacidade regenerativa devida a alta atividade meristemática desses tecidos (BATYGINA *et al.*, 2003; TEIXEIRA DA SILVA, 2013).

Vários meios de cultura vêm sendo utilizados para a técnica TCLt de orquídeas tais como: MS para *Dendrobium nobile* e *Cymbidium aloifolium*, *Aerides maculosum* e *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* (NAYAK *et al.*, 2002; MURTHY e PYATI, 2001; GANTAIT e SINNIHAH, 2012) e WPM para indução de PLBs em *Bulbophyllum peri* e *Epidendrum secundum* (FERREIRA, 2012).

Os reguladores vegetais devem ser ajustados para cada espécie sendo que os mais utilizados para indução e multiplicação de PLBs são: N6-benziladenina (BA), ácido naftalenoacético (ANA), tidiazuron (TDZ) e o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) (LAKSHMANAN *et al.*, 1995; MURTHY e PYATI, 2001; MAYER, 2006; GANTAIT e SINNIHAH, 2012).

Murthy e Pyati (2001) obtiveram 18,2 PLBs por explante em segmentos foliares (bases e ápices) de *Aerides maculosum*, cultivados em meio MS, suplementado com 8,8 µM de BA. O melhor resultado (8,3 PLBs por explante) obtido por Mayer (2006) na regeneração de *Cymbidium* 'Joy Polis' foi utilizando TCL (0,7 a 1,0 mm de espessura) da região mediana do PLB. A melhor resposta de indução de PLBs (17,2) a partir de segmentos foliares de *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* foi obtida em meio MS contendo 6,7 µM de BA (GANTAIT e SINNIHAH, 2012).

O alongamento e enraizamento de orquídeas têm ocorrido em meio sem regulador vegetal e/ou acrescido de carvão ativado. Em espécies com elevada liberação de polifenóis no meio de cultura, o carvão ativado tem propriedade de adsorver tais compostos que são prejudiciais para o desenvolvimento das mesmas. Por exemplo, Roy *et al.* (2011) cultivando PLBs de *Vanda coerulea* ex.Lindl. (Blue Vanda) em meio MS contendo 3 g.L⁻¹ de carvão ativado observaram que as plantas se desenvolveram melhor. Outras espécies como *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza* spp., *Epipactis* spp., *Gymnadenia* spp., *Listera ovata* se desenvolveram melhor depois de terem sido transferidas para meio com carvão ativado. No entanto, para outras espécies como *Ophrys* spp., *Orchis* spp. e *Spiranthes* spp. nenhum efeito estimulatório foi notado, possivelmente nestas espécies não foi observada liberação de polifenóis no meio de cultura prejudicando seu desenvolvimento (VAN WAES, 1987) .

O ácido indolbutírico (AIB) tem sido recomendado por ser uma auxina eficiente na indução de raízes de orquídeas. Asghar *et al.*, (2011) constataram que o AIB (9,8 μ M) adicionado ao meio MS aumentou a porcentagem de enraizamento (97,5%), número de raízes (4,7) e comprimento da raiz (3,5) quando comparado com ANA no enraizamento de *Dendrobium nobile*. Nayak *et al.* (2002) obtiveram 85% de enraizamento de plantas de *Cymbidium aloifolium* e 80% para *Dendrobium nobile* com número médio de raízes (2 e 5 respectivamente), após 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com 9,8 μ M de AIB.

A passagem da fase *in vitro* para a casa de vegetação é uma fase crítica e deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese e absorção de nutrientes. Por isso, é necessário que a planta seja transplantada em um substrato que lhe propicie boas condições para o seu melhor desenvolvimento. O xaxim sempre foi considerado excelente para o cultivo de orquídeas por reter grande quantidade de água por longos períodos proporcionando melhores condições fisiológicas das plantas na aclimatização. Entretanto, como a extração do xaxim está proibida esse substrato deve ser substituído. Os substratos vermiculita e Plantmax®, carvão vegetal, isopor moído e Plantmax® foram os mais propícios para o transplântio de plantas de *Dendrobium nobile* com taxa de sobrevivência superior a 83% (MORAES *et al.*, 2002). Alta porcentagem de sobrevivência (90%) também foi relatada para *Cyrtopodium punctatum* utilizando como substrato casca de coco (DUTRA *et al.* 2009).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação de *Brasilidium praetextum* utilizando a técnica TCLt a partir de tecidos de protocormos ou folhas para a produção de mudas em larga escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, entre o mês de março de 2011 a outubro de 2012.

Flores de *Brasilidium praetextum* foram polinizadas manualmente e após 150 dias, aproximadamente, os frutos foram coletados e as sementes colocadas em dessecador de vidro contendo solução saturada de cloreto de cálcio por sete dias.

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,75% com 0,1% de Tween® 20 por cinco minutos. Em seguida, foram lavadas seis vezes em água destilada esterilizada e inoculadas em meio de cultura básico WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). Após quatro meses, os protocormos germinados *in vitro* foram utilizados como fonte de explantes para os experimentos da técnica TCLt.

2.2 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMOS

Os protocormos (2,5-3 mm) foram seccionados em três segmentos (basal, mediano e apical, com 0,5 - 1 mm de espessura e 1,5 - 2 mm de diâmetro) e colocados com o lado interno do corte em contato com o meio de cultura. As secções foram realizadas sobre gotas de solução estéril de 0,25% de polivinilpirrolidona (PVP) para evitar a oxidação fenólica.

Os TCLts foram inoculados em placa de Petri, contendo meio de cultura WPM, suplementado com 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 ou 24 µM de BA.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (3 regiões x 10 concentrações de BA). Foram inoculados 10 TCLs de cada região do protocormo por placa de Petri e sete repetições por tratamento, totalizando 70 explantes de cada região por tratamento. A porcentagem de explantes que regeneraram PLBs e o número médio de PLBs formados por explante foram avaliados aos 60 dias.

2.2.1 Alongamento e enraizamento dos PLBs regenerados de protocormos

Os PLBs regenerados de protocormos após oito semanas em meio de indução foram transferidos para meio WPM acrescido de 0; 1,5 e 3 g L⁻¹ de carvão ativado. Foram colocados 15 PLBs por frasco e cinco repetições de cada um dos meios de indução, totalizando 75 PLBs por tratamento.

Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de enraizamento, número médio de raízes e a altura das plantas.

2.3 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHAS

Plântulas de *Brasilidium praetextum* obtidas após quatro meses da germinação *in vitro*, em meio WPM, foram utilizadas como fonte de explantes. Secções transversais foram realizadas no primeiro par de folhas formado, medindo de 4 a 6 mm de comprimento. As folhas foram cortadas em cinco secções com 1 a 2mm (basal, segmentos medianos 1, 2 e 3 e apical).

O meio de cultura utilizado foi o WPM, contendo 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 ou 24 µM de BA. As secções foram realizadas sobre gotas de 0,25% de polivinilpirrolidona (PVP) para evitar a oxidação fenólica.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (5 regiões x 10 concentrações de BA). Em cada placa de Petri foram colocadas sete TCLt, com 10 repetições por tratamento, totalizando 70 explantes de cada região.

A porcentagem de explantes que regeneraram PLBs e o número médio de PLBs formados por explante foram avaliados após 60 dias.

2.3.1 Enraizamento dos PLBs regenerados de folhas

Os PLBs regenerados foram transferidos para meio WPM, sem regulador vegetal ou contendo 2 e 4 µM de AIB. Foram colocados 15 PLBs por frasco e cinco repetições de cada meio de indução, totalizando 75 explantes para cada tratamento.

Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de enraizamento e o número médio de raízes por explante.

2.4 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para todas as etapas o meio de cultura utilizado foi o WPM, acrescido de 30g.L^{-1} de sacarose e $5,6\text{ g.L}^{-1}$ de ágar Vetec®. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 1 N e os meios esterilizados a 121°C por 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante o dia e $19^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Para a indução de PLBs as placas de Petri (100x 15 mm) contendo 40 ml de meio de cultura foram mantidas no escuro por 30 dias e depois transferidas para luz (intensidade luminosa de $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas), onde permaneceram por mais 30 dias. Nas etapas de alongamento e enraizamento os explantes foram cultivados em frascos que possuíam 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno. As culturas foram mantidas por 60 dias na presença de luz.

2.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS

As plantas regeneradas medindo aproximadamente dois centímetros de comprimento e contendo três ou mais folhas foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo o substrato vermiculita e Plantmax® florestal (3:1) ou fibra de coco em pó e Plantmax® florestal (1:1). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa $13\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante o dia e $20 \pm 4^{\circ}\text{C}$ durante a noite). Nos primeiros dez dias foram pulverizadas com água manualmente duas vezes ao dia e após esse período a pulverização foi realizada apenas uma vez ao dia. Após 90 dias do transplântio foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e à análise de variância, ANOVA. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico ASSISTAT®. Para o número médio de PLBs os dados foram transformados por $\sqrt{X+0,5}$.

2.7 ANÁLISE MORFOANATÔMICA

Os TCLts de protocormos de *Brasilidium praetextum* cultivados em meio de cultura WPM, sem regulador vegetal foram coletados após 2, 4, 8, 12 e 30 dias e fixados em FAA 50 (formol, ácido acético e etanol 50%,1;1;18). Os TCLs foram desidratados em série alcoólica (10% a 95%) com duração de 1 hora em cada tratamento e emblocados em historresina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Em seguida foram realizados cortes seriados em micrótomo de rotação com espessura de 7 μ m. Os cortes foram corados em azul de toluidina 0,5% (O'BRIEN *et al.*, 1965) dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8). As lâminas foram observadas em microscópio óptico e fotografadas em câmera digital.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMOS

A porcentagem de explantes regenerando PLBs diferiu estatisticamente para os dois fatores: região do protocormo e concentrações de BA testadas. A interação entre os fatores não foi estatisticamente significativa a 5% de probabilidade indicando que os fatores são independentes (ANEXO 1).

As primeiras respostas de indução de PLBs foram observadas após quatro dias de cultivo, independente da concentração de 6-BA e da região do protocormo.

As três regiões do protocormo regeneraram PLBs, no entanto, as regiões apical e basal (FIGURA 1A) foram as que apresentaram as maiores porcentagens de PLBs regenerados e foram significativamente superiores às da região mediana (TABELA 1).

Em relação aos tratamentos com regulador vegetal, a melhor resposta na indução de PLBs foi observada quando os explantes foram cultivados em meio de cultura WPM, suplementado com 20 μM de BA (98,1%), diferindo significativamente das obtidas, no controle e nos meios com 8, 16 e 24 μM de BA (61,0; 70,5; 69,1 e 76,7% respectivamente) (TABELA 1).

TABELA 1- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE TCLt de *Brasiliidium praetextum* EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (μM)	Regeneração de PLBs em diferentes regiões do protocormo (%)			Média geral
	Basal	Mediana	Apical	
Controle	61,4	42,9	78,6	61,0 C
0,5	81,4	70,0	87,1	79,5 AB
1	78,6	67,1	91,4	79,1 ABC
2	85,7	71,4	85,7	81,0 AB
4	78,6	72,9	88,6	80,0 ABC
8	75,7	64,3	71,4	70,5 BC
12	85,7	77,1	91,4	84,8 AB
16	72,7	61,4	72,9	69,1 C
20	100,0	95,7	98,6	98,1 A
24	78,6	62,9	88,6	76,7 BC
Média geral	79,9 a	68,6 b	85,4 a	

As médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De uma maneira geral foi obtida elevada porcentagem de regeneração de PLBs independente da região do protocormo e da concentração de BA adicionada no meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies, como por exemplo, para *Dendrobium candidum*, onde 92% dos explantes (TCL longitudinais de PLB) regeneraram PLBs (ZHAO *et al.*, 2008). Nayak *et al.* (2002) obtiveram 86,7 % dos explantes (TCLt de PLB) de *Dendrobium nobile* regenerando PLBs em meio de cultura MS contendo 11 μM de BA e 60,0% dos explantes de *Cymbidium aloifolium* regenerando PLBs em meio contendo 22 μM de BA. Desta forma, esses resultados foram similares aos observados no presente trabalho,

indicando que os TCLts parecem ser bastante eficientes na regeneração de diferentes espécies de orquídeas, permitindo a propagação massal destas espécies conforme foi relatado por Nhut *et al.* (2003).

O sucesso da regeneração não depende somente do tipo de explante, mas também de outros fatores como, por exemplo, o tipo e concentração de regulador vegetal acrescido no meio de cultura. Neste trabalho, foram testadas diversas concentrações de BA e houve variação da resposta nas diferentes concentrações testadas. Segundo Arditti e Ernst (1993) a formação de PLBs e o desenvolvimento de plântulas necessitam da adição de citocininas e/ou auxinas no meio de cultura e a proporção desses reguladores vegetais variam conforme a espécie em estudo. Os resultados deste trabalho corroboram ao afirmado por esses autores, pois a resposta de regeneração de PLBs obtidas em protocormos cultivados em meio WPM contendo 0,5 μM de BA foi superior à observada em meio de cultura sem adição de regulador vegetal. Entretanto, os PLBs regenerados na ausência de BA e os oriundos de baixas concentrações desse regulador também apresentaram desenvolvimento normal apresentando uma ou mais folhas pequenas após 90 dias de cultivo e foram transferidos para meio de cultura WPM (FIGURA 1B).

Os PLBs regenerados em meio de cultura contendo altas concentrações de BA (16 - 24 μM) formaram um aglomerado de PLBs, em uma estrutura semelhante a calo (FIGURA 1C) e não formaram plantas mesmo após 120 dias de cultivo em meio sem regulador. Resultado semelhante ocorreu para *Cymbidium 'Joy Polis'*, no entanto, os PLBs se converteram em plantas (MAYER, 2006).

A análise de variância para o número médio de PLBs revelou que os fatores concentração de BA e região do protocormo apresentaram diferença estatística, a 5% de probabilidade e não houve interação entre os dois fatores, indicando que as variáveis são independentes (ANEXO 2).

Os TCLs basais do protocormo regeneraram os maiores números médios de PLBs (10,6) foram superiores aos segmentos medianos mais não diferiram dos apicais (TABELA 2). A adição de BA aumentou o número médio de PLBs por explante, sendo que o maior resultado foi obtido quando os segmentos foram cultivados em meio de cultura contendo 16 μM de BA, o qual foi significativamente superior ao controle e ao tratamento com 1 μM de BA (TABELA 2). No entanto, estes PLBs não se desenvolveram em plantas, sendo indicado utilizar no máximo a concentração de 12 μM de BA.

TABELA 2- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Brasilidium praetextum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (µM)	Número médio de PLBs por explante			Média geral
	Basal	Mediana	Apical	
Controle	9,8	6,8	5,9	7,5 C
0,5	11,1	8,6	10,8	10,2 ABC
1	7,8	7,2	8,9	8,0 C
2	9,8	8,9	9,7	9,5ABC
4	9,5	7,6	10,1	9,1 BC
8	9,3	8,1	8,9	8,8 BC
12	11,0	9,9	10,6	10,6 ABC
16	14,3	10,7	13,3	12,8 A
20	13,0	10,5	11,8	11,7 AB
24	10,7	8,0	9,4	9,4 ABC
Média geral	10,6 a	8,6 b	9,9 ab	

Coeficiente de variação (CV) %: 25,8

As médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para raiz quadrada de $\sqrt{X+0,5}$.

A adição de citocinina no meio de cultura foi requerida para aumentar a porcentagem de indução e o número médio de PLBs (TABELA 1 e 2). Assim como foi constatado no presente trabalho, a BA foi relatada por vários autores por ser uma citocinina eficiente na regeneração de várias orquídeas, tais como *Dendrobium nobile* e *Cymbidium aloifolium* (NAYAK *et al.*, 1997, 2002) e *Oncidium* sp. (KALIMUTHU *et al.*, 2007). Resultado inferior ao deste trabalho foi obtido por Mayer (2006) que obteve 8,3 PLBs por explante a partir da região mediana de protocormos de *Cymbidium* 'Joy Polis', em meio MS, acrescido de 10 µM de BA. Mayer (2006) também relatou que em concentrações mais altas de BA foram observados aglomerados de PLBs, que se desenvolveram em plantas após o cultivo em meio sem regulador de crescimento. No entanto, isso não ocorreu com os PLBs de *Brasilidium praetextum* quando também foram cultivados em meio sem regulador.

A vantagem de se utilizar uma baixa concentração de BA (0,5 µM) é que facilita a individualização, alongamento e enraizamento dos explantes, além de reduzir os custos sem que ocorra uma redução do número de plantas de *B. praetextum*.

3.2 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS PLBs REGENERADOS A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMOS

A presença de carvão ativado proporcionou um maior vigor das plantas apesar de não haver diferença estatística em relação ao enraizamento e crescimento das plantas em nenhum dos meios testados contendo 0; 1,5 ou 3 g L⁻¹ de carvão ativado (ANEXO 3).

Durante o cultivo em meio de alongamento observou-se que os PLBs induzidos em meio de cultura sem regulador vegetal ou com baixas concentrações de BA apresentaram plantas com desenvolvimento normal e presença de folhas e raízes. Já nos PLBs que tiveram origem nos meios com concentrações de BA superiores a 16 µM observou-se um aglomerado de PLBs e, mesmo após a transferência destes para um meio de cultura sem regulador vegetal com ou sem carvão ativado, por 60 dias, os PLBs mantiveram-se unidos e não apresentaram raízes (TABELA 3). A transferência desses PLBs por mais 60 dias em meio de cultura com 1 g L⁻¹ de carvão ativado não foi suficiente para os mesmos se desenvolverem em plantas, além de apresentarem coloração amarelada (FIGURA 1C).

TABELA 3- ALTURA E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE PLANTAS DE *Brasiliidium praetextum* ORIUNDAS DE PLBs REGENERADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO BA, CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO CARVÃO ATIVADO POR 60 DIAS.

Meio de indução	0 g. L ⁻¹ de CA		1,5 g. L ⁻¹ de CA		3,0 g. L ⁻¹ de CA	
(BA µM)	Alt (cm)	N. raiz	Alt (cm)	N. raiz	Alt (cm)	N. raiz
0	2,8	4,0	2,4	5,2	2,3	4,1
0,5	1,8	5,9	2,0	3,4	2,0	5,2
1	1,0	6,1	1,1	4,1	1,4	4,0
2	2,1	4,3	2,2	4,4	2,0	4,9
4	0,7	5,2	0,9	2,3	0,9	3,1
8	0,8	1,3	0,9	3,2	1,2	3,0
12	1,0	1,0	1,0	1,4	0,8	1,2
16	0,4	0,0	0,6	0,0	0,7	0,0
20	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0
24	0,5	0,0	0,6	0,0	0,5	0,0
Média	1,1 a	2,8 a	1,2 a	2,4 a	1,3 a	2,6 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados de número de raiz foram transformados para raiz quadrada de $\sqrt{X+0,5}$.

No presente trabalho, a adição de carvão ativado no meio de cultivo dos PLBs oriundos de meios com altas concentrações de BA não foi efetiva para melhorar o desenvolvimento e crescimento das plantas. Galdiano Júnior *et al.* (2011) também observaram que a adição de carvão ativado em meio de cultura MS/2 proporcionou menor eficiência para o crescimento *in vitro* de plantas de *Dendrobium nobile*, sendo que o número de raízes e o comprimento da maior raiz, apresentou menor crescimento pela adição de carvão ativado. Segundo Arditti (2008) o carvão ativado melhora o crescimento de plantas possivelmente devido à aeração do meio de cultivo, ou porque o carvão adsorve etileno que pode inibir o crescimento e diferenciação das plantas.

Nesse estudo não houve diferença no desenvolvimento das plantas cultivadas em meio com ou sem carvão ativado. Resultado semelhante foi obtido por Van Waes (1987) em que nenhum efeito estimulante foi notado em culturas de orquídeas européias *Ophrys* spp., *Orchis* spp. e *Spiranthes* spp. quando cultivadas em meio contendo carvão ativado (0,2 - 3 g.L⁻¹). Tais resultados discordam dos verificados para as orquídeas brasileiras *Cattleya walkeriana* (FARIA *et al.* 2002), *Catasetum fimbriatum* (MORALES *et al.*, 2006) e *Sophranitis coccinea* (SANTOS *et al.* 2006), em que, independentemente do tipo e concentração do meio de cultura utilizado, a adição desse composto propiciou o crescimento *in vitro*.

3.3 INDUÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHAS

A porcentagem de explantes que regeneraram PLBs não apresentou diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para as concentrações de BA no meio de cultivo. Já as regiões da folha utilizadas como explante diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade e a interação entre os fatores: concentração de BA e região da folha apresentou diferença estatística a 5% de probabilidade (ANEXO 4). Isso indicou que os fatores são dependentes e que tanto a região da folha quanto a concentração de BA interferiram na formação de PLBs.

A concentração de BA teve influencia significativa nos explantes oriundos da região apical da folha (FIGURA 1D). A regeneração nos TCLts da região apical foi

significativamente maior em meio contendo 2 μM de BA quando comparadas com a dos explantes do meio com 16 μM de BA (TABELA 4).

Os TCLt da região basal, cultivados em meio contendo ou não BA foram os mais responsivos na regeneração de PLBs sendo que as porcentagens de resposta foram superiores a 92,9%. Quando cultivados em meio WPM contendo 4 e 8 μM de BA ocorreu 100% de regeneração de PLBs. Os TCLs da região mediana (M2 e M3) foram os que apresentaram menores porcentagens de regeneração de PLBs (TABELA 4).

No presente trabalho a porcentagem média de regeneração de PLBs a partir da região basal foi elevada (95,7%) com resultados superiores aos obtidos por Park *et al.* (2002). Esses autores relataram que a melhor resposta na regeneração de TCL da região basal de folhas de *Doritaenopsis* (22,3%) foi obtida quando o meio MS/2 foi acrescido de 22,2 μM de 6-BA, valor muito inferior aos obtidos nesse estudo, até mesmo na ausência de regulador vegetal.

TABELA 4 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs EM TCLt DE *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA 1, 2, 3 (M1, M2 E M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

6-BA (μM)	Regeneração de PLBs (%)					Média
	Basal	M1	M2	M3	Apical	
0	97,1 Aa	12,9 BCa	5,7 BCa	2,9 Ca	27,1 Bab	29,1
0,5	95,7 Aa	15,7 BCa	4,3 Ca	7,1 Ca	30,0 Bab	30,6
1	95,7 Aa	20,0 BCa	5,7 Ca	5,7 Ca	40,0 Bab	33,4
2	92,9 Aa	24,3 BCa	8,6 CDa	0	45,7 Ba	34,3
4	100 Aa	24,3 BCa	2,9 Ca	2,9 Ca	31,4 Bab	32,6
8	100 Aa	10,0 BCa	0	0	30,0 Bab	28,0
12	95,7 Aa	12,9 BCa	4,3 Ca	0	32,9 Bab	29,1
16	88,6 Aa	12,9 Ba	0	0	15,7 Bb	23,4
20	98,6 Aa	7,1 Ca	0	1,4 Ca	30,0 Bab	27,4
24	92,9 Aa	12,9 Ca	1,4 Ca	0	37,1 Bab	28,9
Média	95,7	15,3	3,1	1,9	32,4	

As médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões da folha e letras minúsculas entre as concentrações de BA.

A região apical de folhas de *Brasilidium praetextum* apresentou o melhor resultado de regeneração de PLBs (45,7%) em meio de cultura WPM contendo 2 μM de BA. Estes resultados são inferiores ao obtido para TCLs de ápices de folhas de

Aranda Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* em que obtiveram 83,2 % de regeneração de PLBs em meio MS contendo 2,22 μ M de BA (GANTAIT e SINNIH, 2012).

No presente estudo foi obtido em média 29% de regeneração de PLBs em meio WPM sem adição de regulador. Chen *et al.* (1999) cultivando TCLts de ápices foliares de *Oncidium* Gower Ramsey, em meio MS/2 sem adição de reguladores não obtiveram formação de PLBs. A diferença de resposta pode ter sido devido ao tamanho do explante que nesse estudo foram utilizados ápices foliares com 1-2 mm e os autores citados utilizaram segmentos maiores com 5 mm. Comparando segmentos de folha do híbrido de *Doritaenopsis*, os explantes de 1 mm produziram 4-5 vezes mais PLBs que os explantes com 5 mm.

O número médio de PLBs não apresentou diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para as concentrações de BA no meio de cultivo. Já as regiões da folha utilizadas como explante diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade e não houve interação entre os fatores: concentração de BA e região da folha ao nível de 5% de probabilidade (ANEXO 5).

De uma maneira geral e independente da concentração de BA a região basal foi a mais responsiva, seguida da apical tanto para porcentagem de explantes que regeneraram PLBs quanto para o número médio de PLBs por explante. Em meio de cultura sem regulador e acrescido de até 1 μ M de BA todas as regiões da folha foram responsivas (TABELA 5).

Os números médios de PLBs obtidos de TCLs de todas as regiões da folha variaram entre 6 e 7 em meio de cultura WPM sem regulador vegetal e até a concentração de 1 μ M de BA (TABELA 5). Segundo Lakshmanan *et al.* (1995) o tamanho do explante é fundamental para explicar a alta frequência de regeneração de PLBs. As brotações apicais (6-7 mm) do híbrido de *Aranda* Deborah cultivadas em meio VW, contendo água de coco, produziram poucos PLBs (2,7). No entanto, os TCLs das brotações apicais (0,6-07 mm), cultivados no mesmo meio, induziram cinco vezes mais PLBs (13,6), indicando com isso a existência de células morfogênicas competentes nas brotações apicais. Segundo os autores as células são liberadas de controles correlativos e em condições apropriadas de cultivo expressam o seu potencial de morfogênico como também foi observado nos TCLs foliares de *B. praetextum*. No presente trabalho se somarmos os TCLs de todas as regiões de uma folha é possível obter aproximadamente 40 PLBs em meio de cultivo

sem regulador ou até com 1 μM de BA. Isso confirmou a hipótese de Lakshmanan *et al.* (1995) indicando que nos TCLs de *B. praetextum* tem células morfogênicas competentes e que o tamanho do explante utilizado foi adequado uma vez que possibilitou elevada regeneração de PLBs.

TABELA 5 - NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Brasiliidium praetextum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA 1, 2, 3 (M1, M2 E M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (μM)	NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE					Média
	Basal	M1	M2	M3	Apical	
0	6,9	5,8	12,5	5,5	5,0	7,1 A
0,5	5,4	5,1	8,7	7,2	5,1	6,3 A
1	6,3	6,1	3,0	10,0	6,0	6,3 A
2	6,2	4,4	9,7	-	5,1	5,1 A
4	6,5	8,8	7,0	7,0	6,0	7,1 A
8	8,0	6,1	-	-	4,8	3,7 A
12	7,9	4,7	5,7	-	6,1	4,9 A
16	5,9	6,1	-	-	7,6	3,9 A
20	5,8	3,0	-	4,0	6,3	3,8 A
24	6,0	6,1	6,0	-	4,9	4,6 A
Média	6,5 a	5,6 b	5,3 c	3,4 d	5,7 b	

As médias seguidas de mesma letra na vertical e na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões da folha e letras maiúsculas entre as concentrações de BA.

3.4 ENRAIZAMENTO DOS PLBs REGENERADOS DE TCLt DE FOLHAS

Os PLBs regenerados em meio de cultura de indução contendo até 12 μM de BA que foram transferidos para meio de cultura sem ou com 2 e 4 μM de AIB apresentaram 100% de enraizamento. Não houve diferença estatística a 5% de probabilidade em relação à porcentagem de enraizamento e para o número de raízes dos explantes cultivados em meios acrescidos ou não de AIB (ANEXO 6). Observou-se que as plantas cultivadas em meio sem regulador vegetal apresentaram bulbos (1 a 2 mm) (FIGURA 1E).

No presente trabalho a concentração de AIB não influenciou no número de raízes apesar dos maiores valores obtidos (6,0) terem ocorrido nos meios contendo 2 e 4 μM de AIB (TABELA 6 E FIGURA 1F). Resultados inferiores foram obtidos para *Dendrobium* em que o maior número de raízes (1,8) ocorreu em meio VW

adicionado de 4,9 μM de AIB, após 30 dias (AKTAR *et al.*, 2007). Nayak *et al.* (2002) obtiveram 85% de enraizamento em *Cymbidium aloifolium* e 80% para *Dendrobium nobile* com número médio de raízes 2 e 5, após 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com 9,8 μM de AIB.

TABELA 6- PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE PLANTAS DE *Brasilidium praetextum* ORIUNDOS DE PLBs REGENERADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO BA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO AIB APÓS 60 DIAS.

Meio de indução (BA μM)	0 μM de AIB		2 μM de AIB		4 μM de AIB	
	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes
0	100	4,0	100	5,2	100	6,0
0,5	100	4,2	100	3,0	100	4,1
1	100	4,1	100	6,1	100	4,3
2	100	3,6	100	4,3	100	5,3
4	100	3,3	100	3,4	100	3,4
8	100	2,9	100	6,3	100	3,1
12	100	2,6	100	2	100	2,1
16	26	2,2	0	0	13	2,4
20	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
Média	72,6 a	2,7 a	70 a	3,0 a	71,3 a	3,1 a

As médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

A aclimatização de plantas de *Brasilidium praetextum* foi eficiente apresentando elevadas porcentagens de sobrevivência (94%) nos dois substratos testados após 90 dias do transplântio (FIGURA 1G). A elevada porcentagem de sobrevivência de orquídeas também foi relatada para outras espécies tais como *Cyrtopodium punctatum* utilizando casca de coco (DUTRA *et al.*, 2009) e *Dendrobium nobile* com vermiculita e Plantmax® (MORAES *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados obtidos as plantas se adaptaram as condições *ex vitro*. No presente trabalho, duas misturas de substratos foram utilizadas: Plantmax® e vermiculita na proporção 1:3 e fibra de coco + Plantmax® em proporção igual (1:1) e ambos foram eficientes na sobrevivência e desenvolvimento das plantas de *Brasilidium praetextum*.



FIGURA 1- PLBs E PLANTAS DE *Brasilidium praetextum* REGENERADOS DE TCLt, **A**- TCLt BASAL DO PROTOCORMO COM PLBs APÓS 50 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM SEM REGULADOR VEGETAL (barra- 2mm), **B**- ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs FORMADOS EM MEIO ISENTO DE REGULADOR, CULTIVADOS EM MEIO WPM CONTENDO 1,5 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, APÓS 120 DIAS (Barra- 10 mm) **C**- PLBs FORMADOS EM MEIO CONTENDO 20 µM DE BA, CULTIVADOS EM MEIO WPM CONTENDO 1,5 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, APÓS 120 DIAS (Barra- 10 mm), **D**-REGIÃO BASAL DA FOLHA COM PLBs APÓS 50 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM COM 4 µM DE BA (barra- 3 mm, **E**- PLANTA REGENERADA, COM BULBO, EM MEIO DE CULTIVO WPM SEM ADIÇÃO DE REGULADOR VEGETAL COM CARVÃO ATIVADO, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO (barra- 2 mm), **F**- ENRAIZAMENTO DE PLANTAS REGENERADAS EM MEIO CONTENDO 0, 2 E 4 µM DE AIB, (barra- 10 mm) **G**- PLANTA EM SUBSTRATO PLANTMAX COM FIBRA DE COCO APÓS 90 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO (plantas com 20 mm).

3.6 ANÁLISE MORFOANATÔMICA

A análise histológica indicou que os PLBs tiveram origem direta a partir de células da epiderme em meio de cultura sem adição de regulador vegetal (FIGURA 2 A-D).

As secções transversais de TCL de protocormos cultivadas em meio de cultura WPM após quatro dias apresentaram células em divisão celular. As divisões celulares observadas eram restritas as regiões da epiderme e subepidérmicas (FIGURA 2A). Após 10 dias foi possível observar que algumas células da epiderme em divisão formavam um pequeno grupo de células iniciando a formação de PLBs. As células em divisão que originaram os PLBs caracterizavam-se por serem pequenas, com citoplasma denso e núcleo grande. Destas células originou-se uma pequena protuberância com divisões contínuas resultando na formação dos PLBs (setas) (FIGURA 2B). Após 18-20 dias de cultivo em meio de cultura, as estruturas globulares se tornaram bem desenvolvidas e se diferenciaram em PLBs (setas) (FIGURA 2C), sendo evidenciada a formação de uma camada de células compactas originando a protoderme. Resultados semelhantes foram obtidos para o híbrido de *Doritaenopsis* em que a formação de PLBs iniciou com divisões celulares restritas a regiões epidérmicas subepidérmicas (PARK *et al.*, 2002)

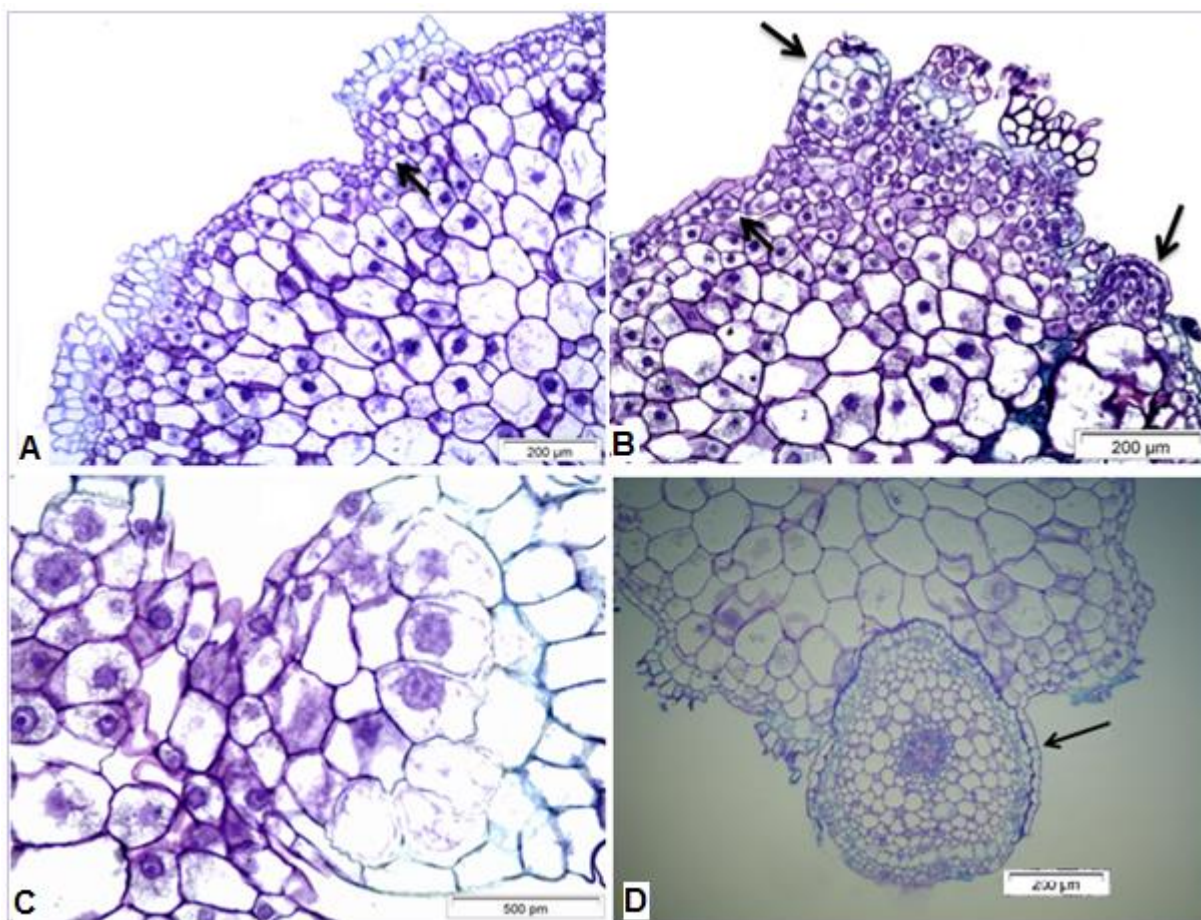


FIGURA 2- REGENERAÇÃO DE PLBs EM *Brasilidium praetextum*. A- CÉLULAS EPIDÉRMICAS E SUBEPIDÉRMICAS EM DIVISÃO CELULAR (SETA), B- INÍCIO DA FORMAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMO (SETA), C- DETALHE DO PLB FORMADO D- PRESENÇA DE PROTODERME DEFINIDA E AUSÊNCIA DE CONEXÃO VASCULAR COM O TECIDO MATERNO (SETA),

3.7 PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Brasilidium praetextum*

Quando comparados os dois tipos de explante, os protocormos apresentaram porcentagem média de resposta superior de regeneração de PLBs em TCLs. No entanto, para o número médio de PLBs, a soma dos melhores resultados foram obtidos nos explantes da folha até a concentração de 4 μM de BA (TABELA 7).

Na figura 3 pode ser observado um esquema do protocolo completo de produção de plantas de *B. praetextum*. Se 1000 sementes forem germinadas em meio WPM, após quatro meses serão obtidos 900 protocormos. Se forem realizadas secções, 3 TCLt em cada um dos 900 protocormo, cultivados em meio WPM

contendo 0,5 μM de BA, após dois meses 80% dos explantes regeneraram PLBs e estes podem produzir 720 PLBs (80% dos 900 protocormos= 720 PLBs/ protocormo). Sendo que cada protocormo produziu 30,5 PLBs na soma das 3 regiões. Isto multiplicado por 720 resultará na produção de 21.960 PLBs. Considerando 100% de enraizamento em meio WPM sem regulador após quatro meses e 94% de sobrevivência no substrato Plantmax® e vermiculita (1:3), após dois meses, foram produzidas 20.642 (94% de 21.960) novas plantas em 12 meses.

Se forem realizadas secções, 5 TCLt em cada uma das 900 folhas, cultivadas em meio WPM sem regulador, após dois meses 29% dos explantes regeneraram PLBs (29% de 900= 261 PLBs/ folha). Sendo que cada folha produziu 42 PLBs na soma das 5 regiões, obteve-se 261 x 42= 10.962 PLBs. Considerando 100% de enraizamento em meio WPM sem regulador após quatro meses e 94% de sobrevivência no substrato Plantmax® e vermiculita (1:3), após dois meses, foram produzidas (94% de 10.962) 10.050 x 2 folhas= 20.100 novas plantas em 12 meses.

Considerando que foram utilizados protocormos e duas folhas obtidas da germinação *in vitro*, obteve-se 40.742 (20.100 de duas folhas + 20.642 do protocormo) novas plantas aclimatizadas após 12 meses.

TABELA 7 – NÚMERO TOTAL DE PLBs REGENERADOS NOS TCLts DE PROTOCORMOS OU FOLHAS DE *Brasiliidium praetextum* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Número total de PLBs		
BA μM	Protocormo ¹	Folha ²
0	22,4	42,7
0,5	30,5	37,7
1	23,9	37,8
2	28,4	30,4
4	27,3	42,4
8	26,4	22,3
12	31,5	29,3
16	38,3	23,0
20	35,1	23,0
24	28,1	27,6
Soma da região apical e mediana		
Soma da região apical, mediana (M1, M2 e M3) e basal.		

Em síntese, podemos inferir que a técnica TCLt a partir de protocormos e folhas demonstrou ser um método eficiente para rápida propagação de *Brasiliidium praetextum*. Estes resultados corroboram com a literatura, em que essa técnica vem

sendo utilizada com eficiência na regeneração de orquídeas, como para o híbrido *Aranda Deborah* utilizando segmentos finos de ápice caulinar (LAKSHMANAN *et al.*, 1995), *Doritaenopsis* utilizando secção transversal da região basal da folha (PARK *et al.* 2002) e para as espécies *Cymbidium aloifolium* e *Dendrobium nobile* utilizando secções finas de PLBs (NAYAK *et al.*, 2002).

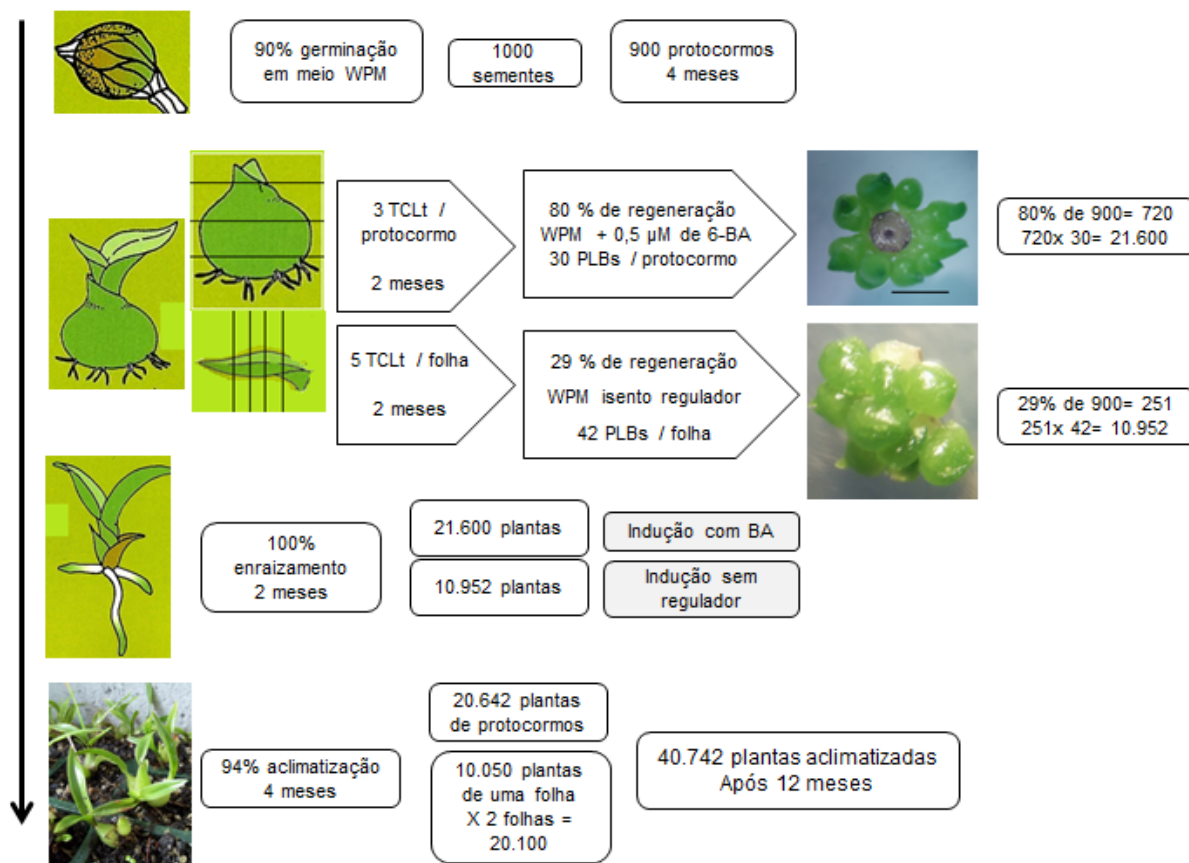


FIGURA 3- ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Brasiliidium praetextum* DESDE A GERMINAÇÃO *in vitro* EM MEIO DE CULTURA WPM, UTILIZANDO O PROTOCORMO E DUAS FOLHAS COMO FONTE DE EXPLANTE PARA A TÉCNICA TCLt.

4 CONCLUSÕES

A técnica TCLt é eficiente para regeneração de PLBs utilizando protocormos e folhas de sementes germinadas *in vitro* como explantes de *Brasilidium praetextum*.

As três regiões do protocormo são responsivas. As folhas também se mostram eficientes principalmente se utilizada à região basal.

Recomenda-se utilizar todas as regiões do protocormo em meio de cultura suplementado com 0,5 μ M de BA e todas as regiões da folha em meio de cultura sem adição de BA.

A regeneração dos PLBs é direta a partir da epiderme e camadas subepidérmicas do protocormo.

Para o alongamento e enraizamento o meio WPM é eficiente, não sendo necessária a adição de AIB ou carvão ativado.

A aclimatização das mudas é eficiente apresentando 94% de sobrevivência em substrato vermiculita e Plantmax®, após 90 dias

Foi estabelecido um protocolo de micropropagação de *Brasilidium praetextum* utilizando a técnica TCLt a partir de protocormos e folhas germinadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- AKTAR, S.; NASIRUDDIN, K. M.; H. U. Q, H. In Vitro Root Formation in *Dendrobium* Orchid Plantlets with IBA. **Journal of Agriculture & Rural Development**, v. 5, v.1, p. 48-51, 2007.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: Wiley Publishers, 1993.
- ARDITTI, J.; **Micropropagation of orchids**, vol. 2, Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.
- ASGHAR, S.; AHMAD, T.; HAFIZ, I. A.; YASEE, M. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of biotechnology**. v.10, n. 16, p. 3097- 3103, 2011.
- BATYGINA, T. B.; BRAGINA, E. A; VASILYEVA, V. E. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica** v. 45, p. 21-34, 2003.
- CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of **Oncidium Gower** Ramsey and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 143-149, 1999.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; USHA RAO, I. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.
- DOCHA NETO, A.; BAPTISTA, D. H.; CAMPACCI, M. A. **Coletânea de Orquídeas Brasileiras 3 - Novos Gêneros (baseados em *Oncidium*)**, São Paulo: Editora Brasil Orquídeas, 2006.
- DRESSLER, R. L. **The orchids. Natural history and classification**. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1981.
- DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination an in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**. v. 96, n. 3, p.235-243, 2009.

FARIA, R. T. ; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.489-492, 2002.

FERREIRA, D. L. **Banco de sementes e sistemas de propagação *in vitro* como estratégia de conservação para *Bulbophyllum peri* Schltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CASSOLI NETO, P.; MANTOVANI, C. Crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindley com adição de carvão ativado. **Revista Fafibe on line**, Março, 2011. Disponível em: <http://www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistafafibeonline/sumario/16/30032011212607.pdf>

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments. **Plant Growth Regul.**, v. 68, n.2, p. 129–140, 2012. DOI 10.1007/s10725-012-9698-y

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; VIJAYAKUMAR, S. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 10, p. 1171-1174, 2007.

LAKSHMANAN, P. L. O. B, C. G-S. G, G. O. B, C-J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda* Deborah using thin section culture. **Plant Cell Reports**. v.14, p. 510-514, 1995.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAYER, J. L. S. **Anatomia e morfogênese *in vitro* de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Orchidaceae).** 124 f. Dissertação (Agronomia - Produção Vegetal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

MORALES, S.; MILANEZE, M. A. G.; MACHADO, M. F. P. S. Effect of activated charcoal for seedling development of *Catasetum fimbriatum* Lindley (Orchidaceae). **Journal of Plant Science**. v.1, n. 4, p.388-391, 2006.

MURTHY H. N.; PYATI A. N. Micropropagation of *Aerides Maculosum* Lindl. (ORCHIDACEAE). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 37, n. 2, p. 223-226, 2001. DOI: 10.1079/IVP2000131

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Robx.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron- induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 3, p. 243–250, 1997.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, n.1, p. 107–116, 2002

NHUT, D. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; ASWATH, C. R. The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 39, n.3, p. 266–276, 2003.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n.2, p. 368-373, 1965.

PARK, S.Y.; YEUNG, E.C.; CHAKRABARTY, D.; PEAK, K.Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports**, v. 21, n.1, p. 46-51, 2002.

ROY, A.R.; PATEL, R.S.; PATEL, V.V.; SAJEEV, S.; DEKA, B.C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325–331, 2011.

SANTOS, A. F.; VENTURE, G. M.; DIAS, J. M. M.; GOULART, M. S.; NOVAIS, M. S.; CECON, P. R.; TEIXEIRA, L. S.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v.46, p.8-12, 2006.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**. Global Science Books, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRANSZKI, J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. **J Plant Growth Regulation**, online: 16 de maio de 2013. DOI 10.1007/S00344-013-9336-6.

VAN WAES, J. Effect of activated charcoal on in vitro propagation of western European orchids. **Acta Horticulturae** (ISHS), v. 212, p. 131-138, 1987. http://www.actahort.org/books/212/212_21.htm

ZHAO, P.; WANG, W.; FENG, F.S., WU, F.; YANG, Z.; WANG-JAN, W. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 2, p. 131–139, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTE REGENERANDO PLBs DE *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DO PROTOCORMO. DADOS TRANSFORMADOS POR ARCOSENO DE X.

Variável	GL	F	P
Região do protocormo	2	13,720	<0,05
Concentração de BA	9	4,558	<0,05
Interação	18	0,304	>0,05

CV (%)= 25,82

ANEXO 2- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE PLBS POR EXPLANTE DE *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DO PROTOCORMO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Variável	GL	F	P
Região do protocormo	2	5,681	<0,05
Concentração de BA	9	4,356	<0,05
Interação	18	0,369	>0,05

CV (%)= 25,97

ANEXO 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ALTURA DA PLANTA E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 60 DIAS.

Variável		GL	F	P	CV (%)
Altura	Concentração de carvão	2	0,0270	>0,05	60,57
Número de raízes	ativado	2	0,0746	>0,05	44,49

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Brasilidium praetextum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO COMO EXPLANTE TCLt DE FOLHA. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Variável	GL	F	P
Região da folha	4	436,770	<0,05
Concentração de 6- BA	9	1,464	>0,05
Interação	36	0,548	<0,05

CV% = 62,67

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Brasiliidium praetextum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO COMO EXPLANTE TCLt DE FOLHA. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Variável	GL	F	P
Região da folha	4	76,4618	<0,05
Concentração de 6- BA	9	1,8610	>0,05
Interação	36	1,3456	>0,05

CV% = 51,29

ANEXO 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE *Brasiliidium praetextum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE AIB NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 60 DIAS.

Variável	Fonte de variação	GL	F	P	CV%
Porcentagem de enraizamento	Concentração de AIB	2	0,1036	>0,05	70,01
Número médio de Raízes		2	0,0078	>0,05	65,17

Porcentagem transformada por arcoseno de x e número médio transformado por $\sqrt{x+0,5}$.

CAPÍTULO III

MICROPROPAGAÇÃO DE *Grandiphyllum pulvinatum* (Lindl.) Docha Neto UTILIZANDO A TÉCNICA “*Thin Cell Layer*” TRANSVERSAL (TCLt) DE PROTOCOLORMOS E DE FOLHAS

RESUMO

As orquídeas são espécies de importância econômica e ecológica que apresentam dificuldade de propagação na natureza e muitas estão ameaçadas de extinção devido à coleta predatória e a devastação do ambiente onde habitam. A técnica TCL possibilita produção rápida e em grande escala de mudas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar qual o tipo, região do explante e concentrações mais responsivas de BA ou ANA na regeneração de PLBs visando estabelecer um protocolo de micropropagação de *G. pulvinatum*. TCLt de folhas e de protocormos foram inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 e 24 μM de BA ou ANA. Após 60 dias, os PLBs regenerados de folhas foram subcultivados em meio de cultura WPM contendo 0; 1,5 ou 3 g.L^{-1} de carvão ativado e os regenerados em protocormos para meio contendo 0; 2,5 e 5 μM de BA ou 2,5 e 5 μM de ANA visando multiplicação, alongamento e enraizamento. As plantas foram transplantadas em Plantmax® e vermiculita (1:3) ou Plantmax® e fibra coco (1:1). A técnica TCLt foi eficiente na regeneração de PLBs, sendo que a sua formação pode ser influenciada pelo explante, região e pela concentração de regulador vegetal utilizada. As melhores respostas foram obtidas com protocormos quando comparados com folhas. Na TCLt de protocormos todas as regiões foram responsivas com a utilização de BA ou ANA e houve diminuição da resposta com o aumento da concentração de ANA ($> 12 \mu\text{M}$). A adição de carvão ativado em meio de cultura proporcionou menor eficiência para o crescimento *in vitro* das plantas regeneradas. Na TCLt de folhas a região mais responsiva foi a basal, na presença de ANA ou BA. O enraizamento dos PLBs e o crescimento das plantas foram obtidos em meio WPM sem regulador. As plantas aclimatizadas apresentaram alta porcentagem de sobrevivência (94%) após 120 dias do transplante utilizando como substrato Plantmax® e vermiculita (1:3). Foi estabelecido um protocolo de micropropagação de *G. pulvinatum* por meio da técnica TCLt de protocormos.

Palavras-chave: Orchidaceae, regeneração de PLBs, BA, ANA

CHAPTER III

Micropropagation of *Grandiphyllum pulvinatum* (Lindl.) Docha Neto using the technique transversal "thin cell layer" (TCLT) of protocorm and leaves

ABSTRACT

Orchids are species of economic importance that have difficulty of propagation in nature and many are threatened of extinction due to predation and devastation of the environment where they inhabit. The TCL technique enables rapid production and large-scale propagation. This study aimed to evaluated what type, region of the explant and the best concentrations of BA or ANA in regeneration of PLBs to establish a protocol for micropropagation of *G. pulvinatum*. The tTCLs of leaves and protocorms were inoculated in WPM, plus 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 μM of BA or ANA. After 60 days, the PLBs regenerated leaves were subcultured on WPM containing 0, 1.5 or 3.0 g.L^{-1} activated charcoal and PLBs regenerated of protocorms to medium containing 0, 2.5 and 5 μM BA or 2.5 and 5 μM ANA to multiplication, elongation and rooting. The regenerated plants were transplanted to Plantmax[®] + vermiculite (1:3) or Plantmax[®] + coconut fiber (1:1). The tTCL technique was effective in regeneration of PLBs, and its formation could be influenced by explant region and plant growth regulator concentration used. The best results were obtained with protocorms compared with leaves. In tTCL protocorm, all regions were responsive to BA and ANA and this response decreased with increasing ANA concentrations ($> 12 \mu\text{M}$). The addition of activated charcoal in the culture medium decreased the regenerated plants growth. In tTCL leaves, the basal region was more responsive in presence of BA and ANA. The PLBs rooting and plant growth were obtained in WPM medium without regulators. The acclimatized plants showed high survival percentage (94%) after 120 days of transplantation using Plantmax[®] and vermiculite (1:3). A protocol for micropropagation of *G. pulvinatum* through protocorm tTCLs was established.

Keywords: Orchidaceae, regeneration of PLBs, BA, ANA

1 INTRODUÇÃO

As plantas de *Grandiphyllum pulvinatum* (Lindl.) Docha Neto têm hábito epífito e apresentam em sua maioria inflorescências exuberantes na cor amarela, com flores de vida longa, vistosas e perfumadas. Ocorrem na Floresta Atlântica e Serra do Mar que são ambientes em devastação, tornando a espécie interessante para programas de reintrodução na natureza e para a horticultura (DOCHA NETO, BAPTISTA e CAMPACCI, 2006).

As sementes de orquídeas apresentam dificuldade de germinação na natureza por não apresentarem órgãos de armazenamento funcional, necessitando de associações micorrízicas para a germinação. Para superar essa dificuldade, a germinação *in vitro* tem sido uma alternativa para muitas espécies de orquídeas. Em condições adequadas, o embrião se desenvolve em uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (ARDITTI e ERNST, 1993).

Vários meios de cultura vêm sendo utilizados para germinação *in vitro* e micropropagação de orquídeas. O meio WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) foi utilizado com sucesso no cultivo de *Brassocattleya x Laeliocattleya* (ARAÚJO *et al.*, 2006) na micropropagação de *Cattleya loddigesii* (ARAÚJO *et al.*, 2009) e de *Epidendrum secundum* (FERREIRA, 2012).

Nas culturas *in vitro* cada protocormo forma um grupo de protocormos secundários ou se mantidos no meio de cultura da germinação se desenvolvem em plantas. Se o agrupamento de protocormos for dividido em 3 a 6 secções e cultivados em meio de indução cada secção irá produzir protocormos adicionais. O cultivo de tecidos de orquídeas como ápices caulinares, folhas, raízes ou inflorescências resulta em formação direta de “protocorm-like bodies” (PLBs) ou por meio de uma fase intermediária de calos (BHOJWANI e DANTU, 2013).

As técnicas de cultura de tecidos têm auxiliado na preservação de espécies, tendo como uma de suas principais vantagens a obtenção de um grande número de indivíduos em espaço reduzido. “Thin cell layer” (TCL) é um sistema eficiente que utiliza um explante muito pequeno que pode ser seccionado longitudinalmente (TCLl) sendo constituído de apenas um tipo de tecido ou a secção pode ser transversal (TCLt) apresentando vários tipos de tecidos (NHUT *et al.*, 2003). Essa técnica tem sido utilizada com sucesso na regeneração de espécies de orquídeas, como: *Aerides maculosum* (MURTHY e PYATI, 2001), *Doritaenopsis* (PARK *et al.*,

2002), *Cymbidium* 'Joy Polis' (MAYER, 2006) e *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' 9 *Vanda coerulea* Griff. (GANTAIT e SINNIH, 2012).

Murthy e Pyati (2001) cultivaram segmentos foliares de *Aerides maculosum* em meio de cultivo MS suplementado com 8,8 μM de BA obtendo 18,2 PLBs por explante. A melhor resposta de indução de PLBs (25,5) a partir de segmentos foliares de *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' 9 *Vanda coerulea* Griff foi obtida em meio MS acrescido de 6,8 μM de TDZ. Quando BA foi adicionada no meio de cultura a melhor resposta foi com 6,7 μM (17,2 PLBs por explante) (GANTAIT e SINNIH, 2012). Park *et al.* (2002) obtiveram baixa taxa de formação de PLBs (22%) a partir de secções finas de folhas do híbrido *Doritaenopsis*, cultivadas em meio de cultura MS/2, contendo 22,2 μM de BA e não houve formação em meio contendo 4,4 μM de BA. Niknejad *et al.* (2011) não obtiveram regeneração de PLBs em segmentos apicais de folhas de *Phalaenopsis gigantea* cultivadas em meio New Dogashima Medium (NDM) suplementado com ANA (0,05- 5,4 μM).

Dentre os componentes que podem ser adicionados aos meios de cultura está o carvão ativado, que tem promovido alguns efeitos benéficos para o alongamento ou enraizamento das plantas como relatado por Schneiders *et al.* (2012). As melhores respostas para a altura da planta, comprimento da maior raiz e o número de raízes por planta de *Cattleya harrisoniana* ocorreram em meio MS acrescido de 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Galdiano Junior *et al.*, (2012) observaram a maior eficiência de desenvolvimento *in vitro* das plantas de *C. loddigesii*, com o uso do meio de cultura MS/2 suplementado com 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

A passagem do cultivo *in vitro* para a casa de vegetação é uma fase crítica e deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese e absorção de nutrientes. Por isso é necessário cuidado na escolha do substrato. Os substratos Plantmax® e vermiculita e Plantmax®, carvão vegetal e isopor moído foram os mais propícios para a aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* com taxa de sobrevivência superior a 83% (MORAES, CAVALCANTE e FARIA, 2002). Alta porcentagem de sobrevivência também foi relatada para outras espécies tais como *Cyrtopodium punctatum* (90%) utilizando como substrato casca de coco (DUTRA, KANE e RICHARDSON, 2009), *Cattleya* chocolate drop x (*C. guttata* x *L. tenebrosa*), com pó de coco (98%) e em fibra de coco (82%) após 90 dias (COLOMBO *et al.*, 2005).

Na literatura não existem relatos de artigos de micropropagação de *Grandiphyllum pulvinatum*.

Assim o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação de *Grandiphyllum pulvinatum* utilizando a técnica TCLt a partir de tecidos de protocormos ou folhas para a produção de mudas em larga escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, entre os meses de março de 2011 e outubro de 2012.

Flores de *G. pulvinatum* foram polinizadas manualmente e após aproximadamente 150 dias os frutos foram coletados. Em seguida, as sementes foram colocadas em dessecador de vidro contendo solução saturada de cloreto de cálcio por sete dias.

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,75% com 0,1 % de Tween® por cinco minutos. Em seguida, foram lavadas seis vezes em água destilada esterilizada e inoculadas em placa de Petri (100 x 15 mm) contendo meio de cultura com a formulação salina WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), sem regulador vegetal, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 5,6 g L⁻¹ de ágar Vetec. Após três meses, os protocormos germinados *in vitro* foram utilizados como fonte de explantes para TCLt de folhas e protocormos.

2.2 REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMOS

2.2.1 Indução e regeneração de PLBs

Os protocormos foram seccionados em três segmentos (TCLt: basal, mediana e apical), com 0,5 – 1 mm de espessura e 2 - 3 mm de diâmetro e colocados com o lado interno do corte em contato com o meio de cultura. Os segmentos foram inoculados em placa de Petri (100 x 15 mm) contendo 40 ml de meio de cultura WPM, acrescido de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 ou 24 μ M de BA ou ANA.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (3 regiões x 10 concentrações de BA ou ANA) com seis repetições. Foram inoculados 10 TCLts de cada região do protocormo por placa de Petri e seis repetições por tratamento, totalizando 60 explantes por tratamento.

A avaliação da porcentagem de explantes com regeneração de PLBs e o número médio de PLBs formados por explante foi realizada após 60 dias.

2.2.2 Multiplicação, alongamento e enraizamento de PLBs

Os PLBs regenerados nas TCLt de protocormos, nos meios de cultivo contendo BA ou ANA, foram transferidos para meio WPM sem regulador vegetal ou contendo BA (2,5 ou 5 μ M) ou ANA (2,5 ou 5 μ M). Foram colocados 12 PLBs por frasco, com cinco repetições, totalizando 60 PLBs por tratamento.

Foram utilizados frascos que possuíam 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno.

A avaliação da porcentagem de explantes que multiplicaram, o número médio de brotações por explante, a altura da planta, o número médio de raízes e o comprimento da maior raiz foi realizada após 60 dias.

2.3 REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE FOLHAS

2.3.1 Indução e regeneração de PLBs

Secções transversais foram realizadas no primeiro par de folhas formadas, medindo de 4 a 6 mm de comprimento. Em cada folha foram feitas cinco secções de 1 a 2 mm (basal, segmentos medianos 1, 2, 3 e apical). Os segmentos foram inoculados em placa de Petri (100 x 15 mm) contendo 40 ml de meio de cultura WPM, acrescido de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 ou 24 μM de BA ou ANA.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (5 regiões x 10 concentrações de BA ou ANA). Em cada placa foram colocados 10 TCLt de cada região, com seis repetições, totalizando 60 explantes de cada região por tratamento.

As avaliações da porcentagem de explantes com regeneração de PLBs e do número médio de PLBs formados por explante foram realizadas após 60 dias.

2.3.2 Alongamento e enraizamento dos PLBs

Os PLBs regenerados nas TCLt de folhas foram transferidos para meio de cultura WPM acrescido de 1,5 ou 3 g.L^{-1} de carvão ativado, mantendo-se um controle sem carvão. Foram colocados 20 PLBs por frasco, com cinco repetições, totalizando 100 PLBs por tratamento.

Foram utilizados frascos que possuíam 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno. A altura das plantas, o número de raízes e o comprimento da maior raiz foram avaliados após 60 dias.

2.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura de todas as etapas *in vitro* foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose e 5,6 g.L^{-1} de ágar Vetec®. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 1 N e os meios esterilizados a 121°C por 20 minutos.

2.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO*

As culturas das etapas de germinação *in vitro*, indução de PLBs, alongamento e enraizamento foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o dia e $19 \pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Para os experimentos de TCLt, os explantes foram mantidos no escuro por 30 dias e, após esse período, foram transferidos para a luz (intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por mais 30 dias.

2.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS

As plantas regeneradas, medindo aproximadamente dois centímetros de comprimento e contendo três ou mais folhas, foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo o substrato vermiculita e Plantmax® florestal (3:1) ou fibra de coco em pó e Plantmax® florestal (1:1). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de $13 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $26 \pm 3^\circ\text{C}$ durante o dia e $20 \pm 4^\circ\text{C}$ durante a noite). Nos primeiros dez dias, as plantas foram pulverizadas manualmente duas vezes ao dia. Após esse período, a pulverização foi realizada apenas uma vez ao dia. Após 120 dias do transplântio foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico ASSISTAT®.

3 RESULTADOS

3.1 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMO UTILIZANDO BA

A porcentagem de explantes que regeneraram PLBs apresentou diferença estatística para as diferentes concentrações de BA no meio de cultivo. No entanto, não houve diferença estatística para a região do protocormo e nem interação entre os dois fatores ($p>0,05$) (TABELA 1 e ANEXO 1).

A porcentagem de explantes regenerando PLBs foi maior no controle (87,3%) e nos meios de cultura suplementados com 0,5 μ M (87,3%), 1 μ M (83,3%) e 2 μ M (80,0%). As respostas de regeneração de PLBs reduziram com o aumento da concentração de BA. No entanto, a região do protocormo não apresentou diferença significativa, indicando que todas foram responsivas (TABELA 1).

TABELA 1- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (μ M)	Explantes regenerando PLBs (%)			Média
	Basal	Mediana	Apical	
0	92,0	80,0	90,0	87,3 A
0,5	90,0	80,0	92,0	87,3 A
1	78,0	90,0	82,0	83,3 AB
2	82,0	80,0	78,0	80,0 AB
4	68,0	50,0	62,0	60,0 B
8	66,0	70,0	80,0	72,0 AB
12	72,0	76,0	76,0	74,7 AB
16	56,0	64,0	54,0	58,0 B
20	64,0	70,0	64,0	66,0 AB
24	70,0	80,0	82,0	77,3 AB
Média	73,8 a	74,0 a	76,0 a	

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões do protocormo e letras maiúsculas na vertical entre as concentrações de BA.

A análise de variância para o número médio de PLBs revelou que os fatores concentração de BA e região do protocormo apresentaram diferença estatística, a

5% de probabilidade e não houve interação entre os dois fatores, indicando que as variáveis são independentes (TABELA 2 e ANEXO 2).

O maior número médio de PLBs ocorreu no meio de cultura contendo a maior concentração de BA (24 μ M) diferindo apenas do número obtido pelo controle. A região mais responsiva foi a apical (8,3) diferindo da mediana (6,4) (TABELA 2). Na figura 1A pode-se observar os PLBs regenerados na região basal do protocormo.

Quando somadas as regiões do protocormo produziram número médio alto, principalmente nas concentrações mais altas de regulador, porém essas plantas apresentaram desenvolvimento mais lento (TABELA 2).

TABELA 2- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Grandiphyllum pulvinatum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (μ M)	Número médio de PLBs por explante			Média	Total
	Basal	Mediana	Apical		
Controle	4,1	4,7	5,6	4,8 B	14,4
0,5	5,8	7,0	7,0	6,6 AB	19,8
1	5,9	5,8	6,8	6,2 AB	18,5
2	7,6	7,0	8,7	7,8 AB	23,3
4	7,6	5,3	8,6	7,2 AB	21,5
8	7,2	6,4	8,3	7,3 AB	21,9
12	9,0	7,8	7,5	8,1 AB	24,3
16	8,6	6,6	10,7	8,6 AB	25,9
20	9,1	6,4	7,9	7,8 AB	23,4
24	10,4	7,2	11,6	9,7 A	29,2
Media	7,5 ab	6,4 b	8,3 a		

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões do protocormo e letras maiúsculas na vertical entre as concentrações de BA.

Nesse estudo houve formação de PLBs nas TCLts das três regiões do protocormos. Segundo Batygina *et al.* (2003), os protocormos possuem vários centros meristemáticos que podem se desenvolver em mais de uma brotação se cultivados em condições adequadas ou podem formar vários PLBs secundários na epiderme do protocormo.

Nesse estudo foi obtida alta porcentagem de regeneração de PLBs utilizando protocormo como explante independente da presença e da concentração de BA. Ao contrário do encontrado por Lee e Lee (2003) que não observaram regeneração direta de PLBs em segmentos finos transversais de protocormos com cinco meses

de germinação *Cypripedium formosanum* cultivados em meio MS/2 ou MS/4 contendo BA (4,4 e 22,2 μ M). Houve formação de PLBs apenas a partir de calos formados em meio contendo 2,4-D. Porém, essa espécie é considerada de difícil propagação. Nayak *et al.* (2002) também observaram pouca resposta em segmentos transversais de protocormos de *Cymbidium aloifolium* e *Dendrobium nobile* cultivados em meio MS sem adição de regulador vegetal. Estes autores, observaram apenas 2 e 3% dos explantes foram responsivos. O aumento progressivo de BA no meio de cultivo para *Cymbidium aloifolium* (até 22 μ M) fez com que a porcentagem de explantes responsivos aumentasse (de 30 para 68%), assim como o número de PLBs por explante responsivo (9,4 - 28,1). Para *Dendrobium nobile*, a melhor resposta (87,9%) foi observada em meio contendo 11 μ M de BA.

Os resultados do presente trabalho, de alta resposta dos explantes, corroboram com os obtidos por Mayer (2006) que obteve 96% de regeneração e número médio de brotações 8,33, obtido da soma de dois segmentos medianos de protocormos de *Cymbidium* 'Joy Polis em meio MS acrescido de 10 μ M de BA. Assim como nesse estudo, também foi observada a formação de uma massa verde escura com pequenos PLBs nas concentrações de 20 e 40 μ M de BA que, após o subcultivo em meio sem regulador, se transformaram em plantas.

3.2 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE PROTOCORMO UTILIZANDO ANA

A porcentagem de explantes que regeneraram PLBs foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os fatores região do protocormo e concentração de ANA, mais a interação entre os dois fatores não foi significativa, sendo os dois fatores independentes (TABELA 3 e ANEXO 3).

Quando considerada a região do protocormo, constatou-se que a porcentagem de explantes regenerando PLBs nos TCLt da região apical e basal (56,8 e 55,2%) foram estatisticamente superiores às das TCLt da região mediana (33,6%) (TABELA 3).

As porcentagens de explantes que regeneraram PLBs diminuíram quando a concentração de ANA no meio de cultivo aumentou. As melhores respostas

ocorreram no meio sem regulador vegetal (93,3 %) e nos suplementados com 0,5 μM (90%) e 1,0 μM (85%) de ANA, chegando a ser de duas a quatro vezes superior a porcentagem observada em algumas concentrações maiores que a 4 μM (43,3%) de ANA (TABELA 3).

TABELA 3- PORCENTAGEM DE EXPLANTES REGENERANDO PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

ANA (μM)	Explantes regenerando PLBs (%)			Média
	Basal	Mediana	Apical	
0	98,0	84,0	98,0	93,3 A
0,5	88,0	84,0	98,0	90,0 A
1	86,0	74,0	96,0	85,0 A
2	60,0	46,0	70,0	58,7 B
4	62,0	20,0	48,0	43,3 BC
8	50,0	16,0	50,0	38,7 BC
12	26,0	-	24,0	16,7 D
16	30,0	4,0	34,0	22,7 CD
20	28,0	-	28,0	18,7 CD
24	24,0	8,0	22,0	18,0 CD
Média	55,2 a	33,6 b	56,8 a	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre as regiões do protocormo e as maiúsculas na vertical entre as concentrações de ANA.

O número médio de PLBs revelou que apenas as diferentes concentrações de ANA apresentaram diferença estatística, a região do protocormo não apresentou diferença e não houve interação entre os dois fatores a 5% de probabilidade, indicando que as variáveis são independentes (TABELA 4 e ANEXO 4).

Os números médios de PLBs foram muito semelhantes em todas as regiões do protocormo e nos meios sem regulador vegetal ou acrescido de ANA. Os números médios do controle e dos explantes cultivados nas concentrações de 2, 4 e 20 μM foram significativamente inferiores aos dos mantidos na concentração de 24 μM de ANA. Entretanto, quando somadas as regiões do protocormo apresentaram alto número médio de PLBs (TABELA 4).

TABELA 4- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Grandiphyllum pulvinatum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO DO PROTOCORMO (BASAL, MEDIANA E APICAL) CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

ANA (μ M)	Número médio de PLBs por explante			Média	Media Total/ protocormo
	Basal	Mediana	Apical		
0	5,4	5,4	6,2	5,6 A	17,0
0,5	5,2	4,7	5,4	5,1 AB	15,3
1	4,5	5,1	6,4	5,3 AB	16,0
2	4,9	5,6	6,2	5,6 A	16,7
4	5,2	6,3	5,5	5,7 A	17,0
8	4,7	6,4	4,4	5,2 AB	15,5
12	6,3	4,0	3,5	4,6 AB	13,8
16	4,1	7,0	3,8	5,0 AB	14,9
20	6,1	-	6,2	4,1 B	12,3
24	4,8	8,5	4,7	6,0 A	18,0
Média	5,1 a	5,3 a	5,2 a		

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre as regiões do protocormo e as maiúsculas na vertical entre as concentrações de ANA.

Nesse trabalho o aumento da concentração de ANA diminuiu a porcentagem de resposta dos explantes e a ausência desse regulador vegetal proporcionou os melhores resultados. Resultados semelhantes ao do presente estudo foram obtidos em PLBs de *Cymbidium aloifolium* e *Dendrobium nobile* em meio contendo ANA (13,5 μ M). A frequência de segmentos com PLBs e o número médio de PLBs por explante foram consideravelmente mais baixos do que em meio suplementado com citocinina. Além disso, foi necessário um tempo maior para a indução dos explantes em meio contendo ANA (NAYAK *et. al.*, 2002).

3.3 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs

Não houve multiplicação dos PLBs em nenhum dos meios testados na ausência de regulador ou contendo 2,5; 5 μ M de ANA ou de BA. No entanto, os explantes cresceram e formaram raízes em todos os tratamentos (TABELA 5).

Para as três variáveis analisadas, o meio WPM sem adição de regulador vegetal e acrescido de ANA apresentaram os melhores resultados sendo diferentes

estatisticamente dos valores observados com a adição de BA (TABELA 5 e ANEXO 5).

TABELA 5- ALTURA, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ (CMR) DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* ORIUNDOS DE TCLt DE PROTOCORMOS, CULTIVADOS EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA OU ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

ANA (µM)	BA (µM)	Altura (cm)	N. Raízes	CMR (cm)
0	0	3,7 ab	7,9 ab	4,8 ab
2,5	0	3,8 ab	9,4 a	5,8 a
5	0	4,1 a	6,3 b	5,4 ab
0	2,5	3,4 b	3,9 c	4,1 b
0	5	2,6 c	2,8 c	1,7 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Nesse estudo não houve multiplicação de PLBs e o crescimento e formação de raízes foi menor na presença de BA. Resultados semelhantes foram obtidos por Nayak *et al.* (2002) em que os PLBs de *D. nobile* induzidos em meio contendo BA apenas se desenvolveram em plantas quando transferidos para meio MS/2 sem adição de regulador vegetal. Martini *et al.* (2001) trabalhando com a orquídea *Gongora quinquenervis* também observaram que a presença da 6-BA inibiu o potencial organogênico. Para a orquídea *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow' a maior quantidade de brotos foi obtida em meio MS na ausência de BA (ARAÚJO *et al.*, 2006).

O efeito inibidor ou estimulador dos reguladores vegetais na formação de brotos e raízes em diferentes plantas pode estar associado à própria concentração, bem como a absorção dos reguladores vegetais pelo meio de cultura (GEORGE, 1996).

3.4 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHA UTILIZANDO BA

A porcentagem de explantes que regeneraram PLBs apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) para as concentrações de BA no meio de cultivo e para a região da folha utilizada. Não houve interação entre os fatores concentração de BA x região

da folha ($p>0,05$) (TABELA 6 e ANEXO 6), indicando que os fatores são independentes.

Os TCLt oriundos da base da folha apresentaram os melhores resultados (50,8%) diferindo estatisticamente das demais regiões, em que os TCLt responderam muito pouco (TABELA 6).

Quando consideradas as concentrações de BA, a melhor porcentagem (20%) foi observada em meio WPM sem adição de regulador vegetal, sendo que em várias concentrações de BA houve regeneração apenas nas TCLt retiradas da região basal. A melhor resposta de regeneração de PLBs (78%) ocorreu na região basal da folha em meio suplementado com 4 μ M de BA (TABELA 6).

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (μ M)	Regeneração de PLBs (%)					Média
	Basal	M1	M2	M3	Apical	
0	62,0	10,0	14,0	4,0	10,0	20,0 A
0,5	50,0	2,0	-	-	-	10,4 ABC
1	50,0	-	-	-	-	10,0 ABC
2	62,0	-	-	-	-	12,4 ABC
4	78,0	4,0	2,0	2,0	4,0	18,0 AB
8	40,0	-	2,0	2,0	2,0	9,2 BC
12	32,0	2,0	-	-	-	6,8 C
16	50,0	-	-	-	2,0	10,4 ABC
20	38,0	-	-	-	2,0	8,0 BC
24	46,0	10,0	-	2,0	8,0	13,2 ABC
Média	50,8 a	2,8 b	1,8 b	1,0 b	2,6 b	

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões do protocormo e letras minúsculas na horizontal entre as concentrações de BA.

Resultados inferiores ao do presente trabalho foram obtidos por Park *et al.* (2002) utilizando secções finas (1mm) do híbrido de *Doritaenopsis*, em que ocorreu pouca resposta de formação de PLBs, no máximo de 22% com 22,2 μ M de BA. Baixa formação de PLBs também foi obtida por Su, Chen e Chang (2006) cultivando *Oncidium* cv. Sweet Sugar em meio MS/2 contendo BA. Os resultados foram de 7% e 14 % de formação de PLBs no ápice da folha em meio suplementado com 1,6 e 16,1 μ M de BA respectivamente. Para a região basal da folha ocorreu a formação de

PLBs em apenas 10,7% com 5 PLBs por explante em meio suplementado com 16 μ M de BA.

O número médio de PLBs não apresentou diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para as concentrações de BA no meio de cultivo. Já as regiões da folha utilizadas como explante diferiram estatisticamente e não houve interação entre os fatores ao nível de 5% de probabilidade (TABELA 7 e ANEXO 7).

A região basal também apresentou maior número médio de explantes responsivos, sendo que o número médio de PLBs variou de 1,9 a 4,7 nas diferentes concentrações de BA (TABELA 7 e FIGURA 1B). Os maiores números médios de PLBs (5-8) por explante foram obtidos com explantes da região mediana e apical, porém esses valores são de um único explante. Os números médios observados na soma dos segmentos da folha foram menores do que os apresentados pelos protocormos (TABELA 4 e 7).

TABELA 7- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Grandiphyllum pulvinatum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

BA (μ M)	Número médio de PLBs por explante					Média	Total/ folha
	Basal	M1	M2	M3	Apical		
0	2,2	1,6	2,1	2,0	1,4	1,9 A	9,0
0,5	2,8	5,0	-	-	-	1,6 A	7,8
1	2,8	-	-	-	-	0,6 A	2,8
2	2,9	1,0	-	-	-	0,8 A	3,9
4	3,0	1,0	1,0	5,0	3,0	2,6 A	13,0
8	3,0	-	5,0	2,0	1,0	2,2 A	11,0
12	2,1	1,0	-	-	-	0,6 A	3,1
16	3,6	-	-	-	2,0	1,1 A	5,6
20	4,7	-	-	-	8,0	2,5 A	12,7
24	3,3	3,2	-	5,0	2,0	2,7 A	13,5
Média	3,0 a	1,3 b	0,8 b	1,4 b	1,7 b		

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões do protocormo e letras minúsculas na horizontal entre as concentrações de BA.

3.5 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBs EM TCLt DE FOLHA UTILIZANDO ANA

Os resultados da análise de variância para a porcentagem de explantes que regeneraram PLBs revelaram que os fatores concentração de ANA e região da folha apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), mas não houve interação entre os dois fatores indicando que as variáveis são independentes (TABELA 8 e ANEXO 8).

As maiores médias para a porcentagem de explantes regenerando PLBs ocorreram na região basal da folha (30%) diferindo estatisticamente das demais, sendo a região apical (15,6%) superior às medianas (4,8 a 5,8%) (TABELA 8).

Houve diminuição da resposta com o aumento da concentração de ANA, sendo que as maiores porcentagens foram obtidas com concentração igual ou inferior a 1 μM de ANA (TABELA 8).

TABELA 8- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

ANA (μM)	Regeneração de PLBs (%)					Média
	Basal	M1	M2	M3	Apical	
0	52,0	6,0	8,0	2,0	30,0	19,6 A
0,5	60,0	12,0	12,0	12,0	18,0	22,8 A
1	46,0	10,0	12,0	12,0	28,0	21,6 A
2	36,0	8,0	2,0	10,0	18,0	14,8 AB
4	30,0	8,0	4,0	2,0	30,0	14,8 AB
8	28,0	2,0	6,0	6,0	12,0	10,8 ABC
12	22,0	4,0	2,0	2,0	10,0	8,0 BCD
16	8,0	2,0	-	2,0	4,0	3,2 CD
20	6,0	2,0	-	-	2,0	2,0 D
24	12,0	4,0	2,0	-	4,0	4,4 CD
Média	30,0 a	5,8 c	4,8 c	4,8 c	15,6 b	

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões do protocormo e letras maiúsculas na vertical entre as concentrações de ANA.

O número médio de PLBs apresentou diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para as concentrações de BA no meio de cultivo e para as regiões da folha utilizadas como explante e não houve interação entre os fatores ao nível de 5% de probabilidade (TABELA 9 e ANEXO 9).

O maior número médio de PLBs ocorreu com os explantes retirados da região apical (3,0) (TABELA 9), sendo os valores considerados baixos quando comparados aos obtidos com os protocormos. As respostas obtidas dos explantes cultivados em meio contendo ANA variaram entre 1,2 e 2,8 PLBs por explante. A soma do número de PLBs de todas as regiões da folha cultivadas em meio contendo ANA foi maior do que a soma total dos explantes cultivada em meio contendo BA (TABELA 7 e 9).

TABELA 9- NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE *Grandiphyllum pulvinatum*, EM RELAÇÃO À REGIÃO BASAL, MEDIANA (M1, M2 e M3) E APICAL DA FOLHA CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

ANA (μM)	Número médio de PLBs por explante					Média	Total/ folha
	Basal	M1	M2	M3	Apical		
0	2,0	1,0	2,3	1,0	2,6	1,8 BC	8,9
0,5	1,9	1,8	4,5	2,5	3,4	2,8 A	14,1
1	2,0	1,2	3,2	4,0	2,4	2,5 A	12,8
2	2,3	2,3	1,0	2,2	3,4	2,2 B	11,2
4	2,5	4,5	1,0	1,0	4,1	2,6 A	13,1
8	2,1	1,0	4,3	2,0	2,1	2,3 B	11,5
12	1,9	5,5	2,0	1,0	2,4	2,6 A	12,8
16	1,5	1,0	-	1,0	5,0	1,7 BC	8,5
20	1,0	2,0	-	-	3,0	1,2 C	6
24	1,5	1,0	3,0	-	2,0	1,5 C	7,5
Média	1,9 b	2,1 b	2,1 b	1,5 c	3,0 a		

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre as diferentes regiões do protocormo e letras maiúsculas na vertical entre as concentrações de ANA.

Ao contrário desse estudo, Niknejad, Kadir e Kadzimin (2011) não obtiveram regeneração de PLBs em segmentos apicais de folhas de *Phalaenopsis gigantea* cultivadas em meio New Dogashima Medium (NDM) suplementado com ANA (0,05-5,4 μM), ocorrendo regeneração apenas com a combinação de ANA e TDZ. O mesmo foi observado por Mayer, Stancato e Appezzato-Da-Glória (2010) em que não houve formação de PLBs de *Oncidium flexuosum* em ápices foliares de 5 mm cultivados em meio MS/2 contendo ANA.

De uma maneira geral, as melhores respostas ocorreram com TCLt da região basal, seguido da apical. De acordo com Teixeira da Silva (2013) folhas jovens derivadas de protocormos apresentam alta capacidade regenerativa e a melhor região (basal- apical) depende da espécie.

3.6 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS PLBs

Os PLBs de 3-5 mm foram transferidos para meio WPM com carvão ativado (0; 1,5 e 3,0 g.L⁻¹) e apresentaram 100% de enraizamento e alongamento da parte aérea e de raízes em todos os meios testados. Os PLBs regenerados vindos de meio WPM contendo BA apresentaram diferença estatística para altura das plantas e para o comprimento da maior raiz. O número médio de raízes não diferiu ($p>0,05$) quando os PLBs foram cultivados em meio WPM contendo carvão ativado (TABELA 10 e ANEXO 10).

Os explantes cultivados em meio contendo 3 g.L⁻¹ de carvão ativado e no controle apresentaram as melhores médias para a altura da planta, porém para o comprimento da maior raiz as melhores respostas foram obtidas no controle e em meio com 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, não havendo diferenças no número médio de raízes nos três meios testados (TABELA 10 e FIGURA 1C).

Os PLBs regenerados, obtidos de meio de cultura WPM contendo ANA, apresentaram diferenças estatísticas para altura das plantas e para o número de raízes. O comprimento da maior raiz não diferiu estatisticamente ($p>0,05$), quando as plantas foram cultivadas em meio WPM contendo ou não carvão ativado (TABELA 10 e ANEXO 11).

A altura da planta foi menor em meio contendo 3 g.L⁻¹ de carvão ativado. O número médio de raízes foi maior nos explantes cultivados em meio contendo 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e o comprimento da maior raiz com a ausência ou a presença de carvão ativado (TABELA 10).

TABELA 10- ALTURA (AL), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES (NR) E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ (CMR) DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum*, CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO CARVÃO ATIVADO E CULTIVADO POR 60 DIAS.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	PLBs regenerados em meio contendo 0-24 µM de BA (por 60 dias)			PLBs regenerados em meio contendo 0-24 µM ANA (por 60 dias)		
	AL (cm)	NR	CMR (cm)	AL (cm)	NR	CMR (cm)
0	3,3 a	3,4 a	4,2 a	2,8 a	3,3 b	3,4 a
1,5	2,5 b	4,1 a	3,4 ab	2,9 a	4,6 a	3,7 a
3	3,1 a	3,9 a	2,8 b	2,0 b	3,6 ab	3,6 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De uma maneira geral, o carvão ativado não foi determinante no alongamento da parte aérea e desenvolvimento das raízes. No entanto, Van Waes (1987) obtiveram alta mortalidade das plantas em meio BM contendo carvão ativado para as espécies *Ophrys fuciflora* (87,9%), *Orchis macula* (78,4%), *Orchis morio* (96,3%) e *Spiranthes spiralis* (17,6%). O efeito benéfico da adição de carvão ativado para a formação de raízes foi relatado por Schneiders *et al.* (2012), que observaram as melhores respostas para o comprimento da maior raiz e o número de raízes por planta de *Cattleya harrisoniana* em meio MS acrescido de 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Também, Galdiano Junior *et al.* (2012) observaram uma maior eficiência de desenvolvimento *in vitro* das plantas de *Cattleya loddigesii*, em relação ao número de raízes e comprimento da maior raiz, com o uso do meio de cultura MS/2 suplementado com 2g.L⁻¹ de carvão ativado.

Os efeitos promotores do carvão ativado podem ser principalmente atribuídos a sua função de retenção de substâncias tóxicas presentes no meio de cultura como, por exemplo, o 5-hidroximetil-furfural (HMF) produzido a partir da degradação da sacarose na autoclavagem, ou também por reduzir a ação de metabólitos tóxicos, tais como compostos fenólicos ou etileno que são eliminados pelo explante (PAN e VAN STADEN, 1998).

3.7 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS

A aclimatização de plantas de *Grandiphyllum pulvinatum* apresentou elevada porcentagem de sobrevivência no substrato vermiculita e Plantmax[®] florestal (94%), e no substrato fibra de coco em pó e Plantmax[®] florestal (92%), após 120 dias do transplantio (FIGURA 1D).

A combinação de Plantmax[®] com outros substratos, assim como nesse estudo, tem apresentado bons resultados na aclimatização. Os substratos Plantmax[®] e vermiculita e Plantmax[®], carvão vegetal e isopor moído foram os mais propícios para a aclimatização de plantas de *Dendrobium nobile* (MORAES, CAVALCANTE e FARIA, 2002), com taxa de sobrevivência superior a 83%. Alta porcentagem de sobrevivência também foi relatada para outras espécies, tais como 90% para *Cyrtopodium punctatum*, utilizando como substrato casca de coco (DUTRA *et al.*,

2009), 98% para *Cattleya* chocolate drop x (*C. guttata* x *L. tenebrosa*) transplantada em substrato de pó de coco ou 82% em fibra de coco, após 90 dias do transplante (COLOMBO *et al.*, 2005). O contrário foi observado por Ferreira (2012), em que as plantas de *Bulbophyllum peri*, após 90 dias de aclimatização apresentaram apenas 35% de sobrevivência em substrato vermiculita e Plantmax®.

O pó de coco e a vermiculita são substratos de partículas pequenas, o que propicia uma retenção maior de líquido. A fibra de coco, casca de coco e carvão vegetal apresentam partículas maiores, diminuindo a absorção de água e melhorando a aeração das raízes, de modo que o substrato deve ser ajustado a cada espécie ou gênero (FERREIRA, 2012).

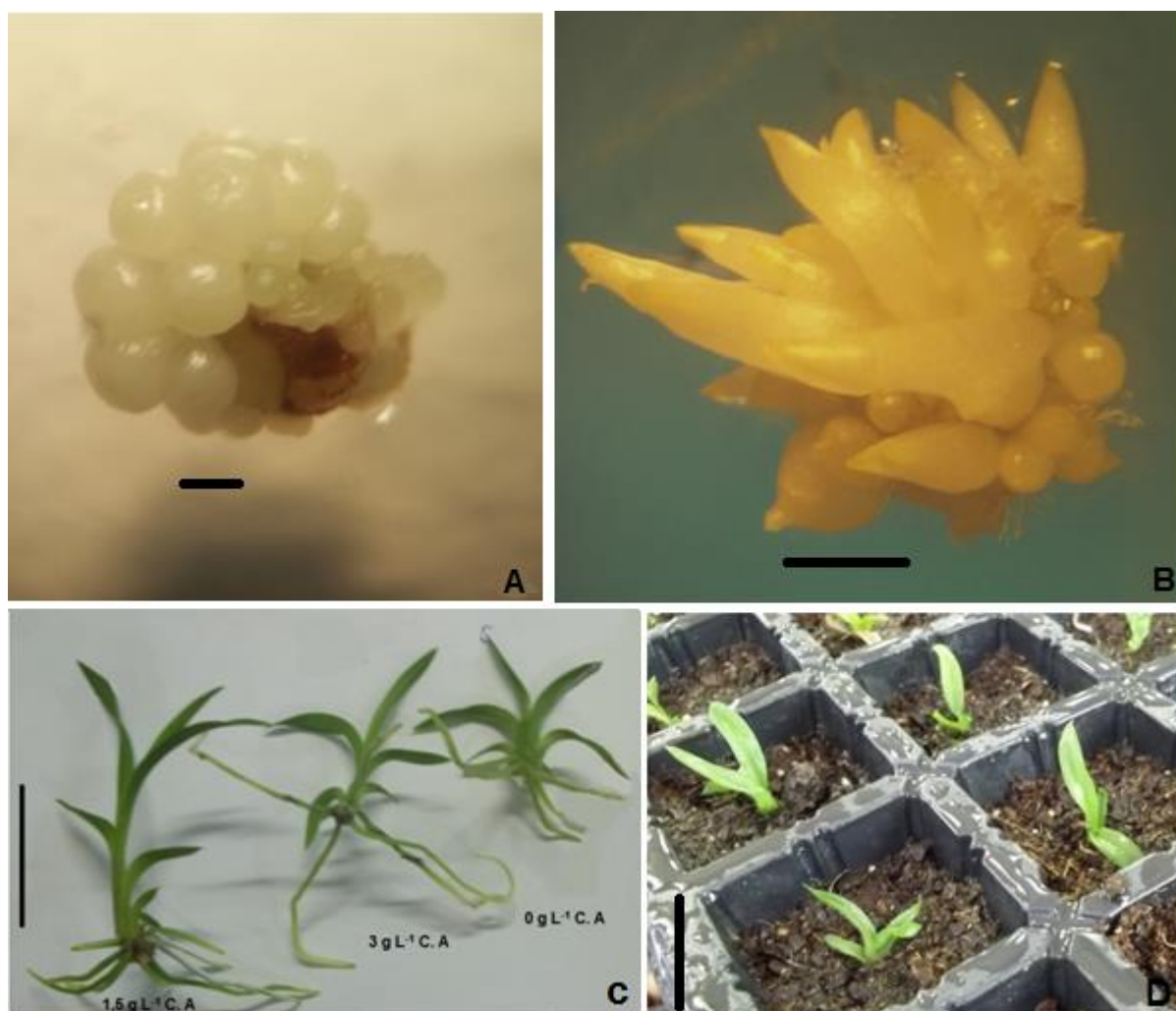


FIGURA 1- REGENERAÇÃO DE PLBs DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum*: A- REGIÃO BASAL DO PROTOCORMO CONTENDO PLBs APÓS 30 DIAS CULTIVADOS NO ESCURO EM MEIO WPM CONTENDO $0,5 \mu\text{M}$ DE BA (barra - 1 mm); B- REGIÃO BASAL DA FOLHA COM PLBs REGENERADOS APÓS 30 DIAS CULTIVADOS NO ESCURO EM MEIO WPM CONTENDO $0,5 \mu\text{M}$ DE BA (barra- 2 mm); C- PLANTAS CULTIVADAS EM WPM, ACRESCIDO DE 0; 1,5; 3 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (barra: 20 mm); D- PLANTAS ACLIMATIZADAS APÓS 90 DIAS EM PÓ DE COCO E PLANTMAX (barra: 20 mm).

3.8 ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *G. pulvinatum*

Com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível estabelecer um protocolo completo de produção de plantas de *Grandiphyllum pulvinatum* a partir de TCLt de protocormos. Se 1000 sementes forem germinadas em meio WPM, após quatro meses serão obtidos 940 protocormos. Se forem realizadas 3 TCLt em cada um dos 940 protocormo, resultam em 2820 explantes quando cultivados em meio WPM contendo 0,5 μ M de BA, ou em meio WPM sem ANA, após dois meses 87% dos explantes regenerarão PLBs (87% de 940= 818 PLBs/ protocormo), ou em meio sem ANA (93% de 940= 874). Cada protocormo pode produzir 20 PLBs na soma das 3 regiões, em meio contendo BA obtendo $818 \times 20 = 16.360$ PLBs. Em meio acrescido de ANA cada protocormo produzirá 17 PLBs obtendo $874 \times 17 = 14.861$ PLBs. Considerando 100% de enraizamento em meio WPM sem regulador após quatro meses e 94% de sobrevivência no substrato Plantmax® e vermiculita (1:3), após dois meses, foram produzidas 15.378 novas plantas (94% de 16.360) induzidas em meio com BA e 13.966 novas plantas (94% de 14.858) aclimatizadas regeneradas em meio isento de ANA após 12 meses (FIGURA 2).

A figura 3 apresenta esquematização do protocolo completo de produção de plantas de *Grandiphyllum pulvinatum* a partir de folhas. Se 1000 sementes forem germinadas em meio WPM, após quatro meses serão obtidos 940 protocormos com duas folhas que serão utilizadas na TCLt. Se forem realizadas cinco TCLt em cada uma das 900 folhas, cultivadas em meio WPM, acrescido de 4 μ M de BA, após dois meses 18% dos explantes regenerarão PLBs (18% de 940= 169 PLBs/ folha) e 22,8 % dos explantes regenerarão PLBs em meio WPM contendo 0,5 μ M de ANA (22,8% de 940= 214 PLBs/ folha). Sendo que cada folha pode produzir 13 PLBs na soma das 5 regiões (BA), obtém-se $169 \times 13 = 2.197$ PLBs e 14,1 PLBs na soma das 5 regiões em meio contendo ANA, obtém-se $214 \times 14,1 = 2.996$. Considerando 100% de enraizamento em meio WPM sem regulador após quatro meses e 94% de sobrevivência no substrato Plantmax® e vermiculita (1:3), após dois meses, serão produzidas (94% de 2.021) $\times 2$ folhas= 4.130 novas plantas em 12 meses (BA) e (94% de 2.996) $\times 2$ folhas= 5.632 novas plantas em 12 meses (ANA).

Os protocormos regenerados em meio contendo BA apresentaram maior produção de plantas como se pode observar na figura 2. Foram superiores na

produção de PLBs em relação às folhas que mesmo utilizando duas folhas por protocormo apresentaram duas a três vezes menos plantas.

Por isso, é indicado o uso do protocormo em meio de indução com BA para regeneração de novas plantas.

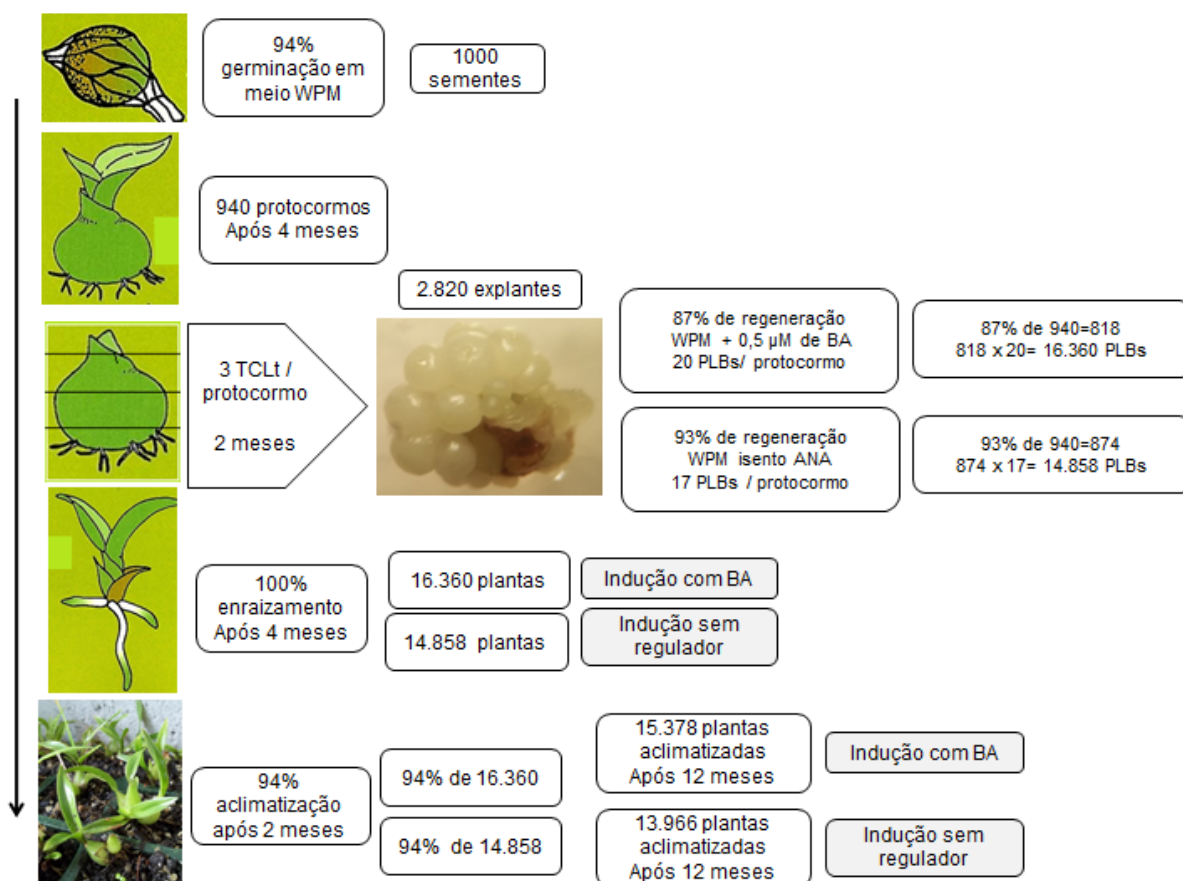


FIGURA 2- PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* A PARTIR DA REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE PROTOCORMOS GERMINADOS EM MEIO WPM.

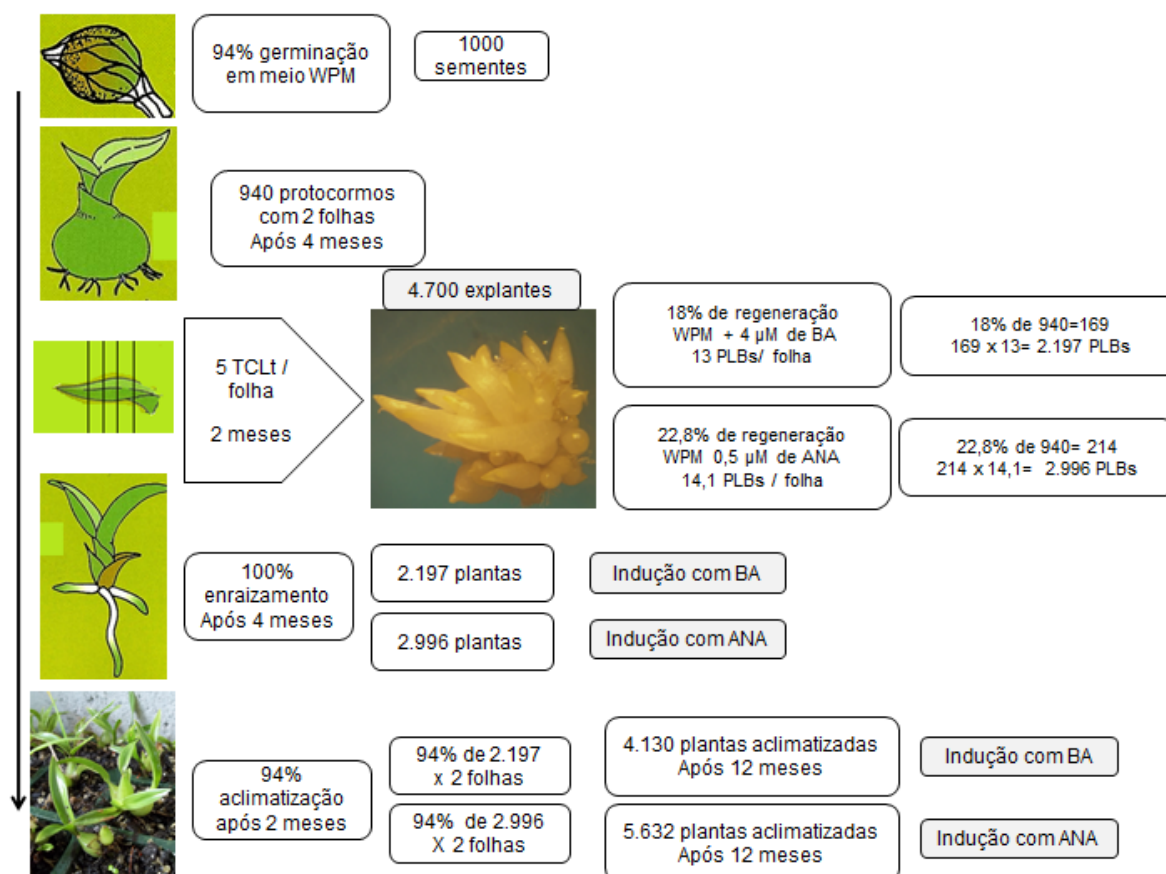


FIGURA 3- PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Grandiphyllum pulvinatum* A PARTIR DA REGENERAÇÃO DE PLBs A PARTIR DE TCLt DE FOLHAS GERMINADOS EM MEIO WPM.

4 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a técnica TCLt foi eficiente para regeneração de PLBs e foi influenciada pelo tipo de explante, região e pela concentração de regulador vegetal utilizada.

O melhor tipo de explante foi o protocormo que apresentou todas as regiões responsivas. Recomenda-se adicionar no meio de cultura WPM BA, em baixa concentração (0,5 μ M) para a indução de PLBs, seguido de transferência para meio de cultura WPM isento de regulador vegetal que permitiu melhor enraizamento e crescimento das plantas. O carvão vegetal não foi essencial para o desenvolvimento de raízes e das plantas. A mistura de substratos vermiculita e Plantmax® é recomendada para o transplantio e aclimatização de mudas.

A TCLt de folhas não foi eficiente para a produção de mudas em grande escala de *G. pulvinatum*, uma vez que apenas a região basal foi responsiva.

Foi estabelecido um protocolo de micropropagação de *Grandiphyllum pulvinatum* por meio da técnica TCLt de protocormos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. da; VILLA, F.; ROCHA, H. S.; COSTA, F. C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídea em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n.2, p. 68-73, 2006.

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M. RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences Maringá**, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: Wiley Publishers, 1993

BATYGINA, T .B.; BRAGINA, E.A; VASILYEVA, V .E. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia**, Series Botanica, v. 45, n. 2, p. 21-34, 2003.

BHOJWANI, S. S. DANTU, P. K. **Plant tissue culture, an introductory text**. New Delhi: Springer, p. 245-273, 2013.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.

DOCHA NETO, A.; BAPTISTA, D. H.; CAMPACCI, M. A. **Coletânea de Orquídeas Brasileiras 3 - Novos Gêneros (baseados em *Oncidium*)**. São Paulo: Editora Brasil Orquídeas, 2006.

DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination an in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, v. 96, n. 3, p.235-243, 2009.

FERREIRA, D. L. **Banco de sementes e sistemas de propagação *in vitro* como estratégia de conservação para *Bulbophyllum peri* Schltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.801-807, 2012

GANTAIT, S.; SINNIHA, U. R. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' 3 *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments. **Plant Growth Regulation**, v. 68, n.2, p. 129–140, 2012. DOI 10.1007/s10725-012-9698-y

GEORGE, E. F.; **Plant Propagation by Tissue Culture: in practice**. Great Britain: Exegetics Limited, v. 2, 1996.

LEE, Y-I; LEE, N. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 39, n.5, p.475–479, 2003.

LLOYD, G.; McCOWN, Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARTINI, C. M.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagação de orquídea *Gongora quinquinervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, out. 2001.

MAYER, J. L. S. **Anatomia e morfogênese in vitro de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Orchidaceae)**. 124 f. Dissertação (Agronomia - Produção Vegetal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAYER, J. L. S.; STANCATO, G.C.; APPEZZATO da GLORIA, B. Direct regeneration of protocormo-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 411-416, 2010. DOI 10.1007/s11240-010-9782-9

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

MURTHY, H. N.; PYATI, A. N. Micropropagation of *Aerides Maculosum* Lindl. (ORCHIDACEAE). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 37, n. 2, p. 223-226, 2001.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, n.1, p. 107–116, 2002

NIKNEJAD, A. KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B. *In vitro* plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.56, p. 11808-11816, 2011.

NHUT, D. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; ASWATH, C. R. The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 39, n.3, p. 266–276, 2003.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p. 155–163, 1998.

PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; CHAKRABARTY, D.; PEAK, K. Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports**, v. 21, n.1, p. 46-51, 2002.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, n.2, p. 185-191, 2012.

SU, Y.J.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Efficient and repetitive production of leaf-derived somatic embryos of *Oncidium*. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 107-110, 2006.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**. Global Science Books, 2013. Disponível em: http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/FOB_7%281%291-52o.pdf

VAN WAES, J. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of western European orchids. **Acta Horticulturae** (ISHS), v. 212, p. 131-138, 1987.

ANEXOS

ANEXO 1- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DO PROTOCORMO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região do protocormo	2	0,1532	>0,05
Concentração de BA	9	3,4735	<0,05
Interação	18	0,3817	>0,05
CV% = 37,46			

ANEXO 2- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DO PROTOCORMO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região do protocormo	2	5,0679	<0,05
Concentração de BA	9	4,4718	<0,05
Interação	18	1,0815	>0,05
CV (%): 33,99			

ANEXO 3- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE ANA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DO PROTOCORMO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região do protocormo	2	23,975	<0,05
Concentração de ANA	9	29,809	<0,05
Interação	18	0,5287	>0,05
CV% = 40,59			

ANEXO 4- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE ANA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DO PROTOCORMO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região do protocormo	2	0,6394	>0,05
Concentração de ANA	9	2,7023	<0,05
Interação	18	0,4620	>0,05
CV (%): 45,05			

ANEXO 5- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ALTURA DAS PLANTAS, NUMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE ANA OU BA NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Variável	Fonte de variação	GL	F	P	CV (%)
Altura da planta	Regulador	4	13,988	<0,05	13,45
Número de raízes		4	45,505	<0,05	21,15
Comprimento da maior raiz		4	20,865	<0,05	25,38

ANEXO 6- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTES REGENERANDO PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO COMO EXPLANTE TCL DE FOLHAS, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região da folha	4	174,9338	<0,05
Concentração de BA	9	3,3219	<0,05
Interação	36	1,3194	>0,05
CV% = 98,83			

ANEXO 7- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE BA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DA FOLHA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região da folha	4	58,0872	<0,05
Concentração de BA	9	0,2016	>0,05
Interação	36	0,9883	>0,05
CV% = 38,85			

ANEXO 8- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTES REGENERANDO PLBs DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE ANA NO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO COMO EXPLANTE TCL DE FOLHAS, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região da folha	4	43,0589	<0,05
Concentração de ANA	9	12,1869	<0,05
Interação	36	1,4635	>0,05
CV% = 86,67			

ANEXO 9- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES DE *Grandiphyllum pulvinatum* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE ANA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO INOCULADA DA FOLHA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. DADOS TRANSFORMADOS POR $\sqrt{X+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Região da folha	4	11,7923	<0,05
Concentração de ANA	9	5,0279	<0,05
Interação	36	0,9883	>0,05
CV% = 41,91			

ANEXO 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ALTURA DAS PLANTAS, NUMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ DE *Grandiphyllum pulvinatum*, ORIUNDO DE MEIO DE INDUÇÃO CONTENDO BA EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Variável	Fonte de variação	GL	F	P	CV (%)
Altura da planta	Carvão ativado	2	5,2027	>0,05	18,44
Número de raízes	Carvão ativado	2	2,1131	<0,05	21,20
Comprimento da maior raiz	Carvão ativado	2	6,2258	>0,05	24,68

ANEXO 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ALTURA DAS PLANTAS, NUMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ DE *Grandiphyllum pulvinatum*, ORIUNDO DE MEIO DE INDUÇÃO CONTENDO ANA, EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Variável	Fonte de variação	GL	F	P	CV (%)
Altura da planta	Carvão ativado	2	8,6724	>0,05	20,69
Número de raízes	Carvão ativado	2	4,1528	>0,05	27,95
Comprimento da maior raiz	Carvão ativado	2	0,2694	<0,05	30,88